



**Hugo Ferrão Dias de
Almeida**

**Estudo da estabilidade térmica e bária da levedura
*Pichia stipitis***



**Hugo Ferrão Dias de
Almeida**

**Estudo da estabilidade térmica e bária da levedura
*Pichia stipitis***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor Carlos de Pascoal Neto
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutor Paulo Costa Lemos
investigador auxiliar do REQUINTE

agradecimentos

À Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier agradeço o apoio concedido ao longo da realização do trabalho experimental, a orientação científica, a sua disponibilidade contínua, os inúmeros conhecimentos transmitidos, amizade e carinho.

Ao Investigador Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, co-orientador deste trabalho, agradeço a orientação, o valioso apoio proporcionado ao longo do trabalho experimental e amizade.

À colega de laboratório Susana agradeço o apoio durante a parte experimental, colaboração e amizade demonstrada.

Aos colegas e amigos do laboratório de bioquímica agradeço a ajuda e companheirismo transmitidos.

À Cláudia agradeço o incansável incentivo e ajuda neste trabalho experimental, carinho, amizade e entusiasmo que me concedeu. Obrigado pela confiança que depositaste em mim.

Ao meu irmão agradeço a amizade, carinho e apoio durante o meu percurso académico. A força da música une-nos.

Aos meus pais agradeço o incentivo, amizade, carinho e apoio que sempre demonstraram durante toda a minha formação académica, especialmente na concretização deste projecto.

palavras-chave

Pichia stipitis, taxa específica de crescimento, tempo de duplicação, unidade formadora de colónia, inactivação térmica, inactivação bária, taxa específica de morte.

resumo

O objectivo principal deste trabalho foi a determinação da estabilidade térmica e bária da levedura *P. stipitis*. Como objectivo secundário, tentou-se desenvolver um método rápido de quantificação da levedura para facilitar o estudo da estabilidade térmica e bária. Primeiramente, efectuaram-se rectas de calibração e realizaram-se curvas de crescimento seguindo o crescimento microbiano por diferentes técnicas experimentais, nomeadamente, a densidade óptica, a contagem por câmara de Neubauer e a contagem por colónias. Foi possível verificar que é possível quantificar a levedura de modo rápido por contagem em câmara de Neubauer e por densidade óptica. A taxa específica de crescimento obtida foi de $0,4262\text{h}^{-1}$, com um tempo de duplicação de 1h38min.

O estudo da inactivação térmica foi realizado com temperaturas entre 35,0 °C e 45,0 °C e a inactivação bária com pressões entre 50,0 MPa e 250,0 MPa. À medida que aumenta a temperatura e pressão aumenta a velocidade de destruição da levedura. Os tempos de meia-vida para a inactivação térmica variaram entre 88,67 e 1,04 min e para a inactivação bária entre 4,30 e 0,31min. Para a inactivação térmica foi obtida uma energia de activação de 402899 J/mol, enquanto para a inactivação bária foi obtido um volume de activação de $-89\text{ cm}^3/\text{mol}$.

keywords

***Pichia stipitis*, specific growth rate, generation time, colony-forming unit, thermal inactivation, baric inactivation, specific rate of death.**

abstract

The principal objective of this study was to determine the thermal and baric estabillity of yeast *P. stipitis*. As a secondary objective, a development of a rapid method for quantification of the yeast was tried, to facilitate the study of thermal stability and barium. First, calibration line and growth curves was done following the growth of microbial growth by different experimental techniques, including optical density, count by a Neubauer chamber and by colony-forming unit. It was noted that it is possible to quantify the yeast quickly by counting in a Neubauer chamber and optical density. The specific growth rate obtained was 0,4262, with a doubling time of 1h38min.

The study of thermal inactivation was carried out with temperatures between 35,0°C and 45,0°C and the baric inactivation pressures between 50,0 MPa and 250,0 Mpa. As the temperature and pressure increases, the rate of destruction of the yeast increases too. The times of half-life for thermal inactivation ranged between 88,67 and 1,04 min and for baric inactivation between 4,30 and 0,31 min. An activation energy of 402899 J/mol for the thermal inactivation was obtained, while for the baric inactivation was obtained a activation volume of -89 cm³/mol.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
NOMENCLATURA	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 RECURSOS RENOVÁVEIS	7
2.1.1 BIOREFINARIA DE CULTURA COMPLETA – “WHOLE CROP BIOREFINERY”	8
2.1.2 BIOREFINARIA VERDE – “GREEN BIOREFINERY”	8
2.1.3 BIOREFINARIA DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS – “LIGNOCELLULOSE FEEDSTOCK BIOREFINERY”	9
2.2 BIOMASSA VEGETAL	10
2.2.1 BIOMASSA VEGETAL HIDROLISADA COMO FONTE DE CARBONO FERMENTÁVEL POR MICRORGANISMO	12
2.3 MICRORGANISMOS	13
2.3.1 FUNGOS UNICELULARES – LEVEDURAS	13
2.3.2 <i>PICHIA STIPITIS</i>	14
2.3.3 FERMENTAÇÃO DE PENTOSE	16
2.4 NUTRIÇÃO MICROBIANA	17
2.5 MEIOS DE CULTURA	19
2.6 CRESCIMENTO DE POPULAÇÕES MICROBIANAS UNICELULARES	20
2.6.1 CRESCIMENTO DESCONTÍNUO	21
2.7 MONITORIZAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO	24
2.7.1 TÉCNICA DE CONTAGEM POR MICROSCOPIA DIRECTA	25
2.7.2 TÉCNICA DE CONTAGEM POR PLACA DE PETRI	26
2.7.3 TÉCNICA TURBIDIMÉTRICA	27
2.7.4 TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DE PESO SECO	28
2.8 INFLUÊNCIA DE FACTORES AMBIENTAIS SOBRE O CRESCIMENTO	28
2.8.1 EFEITO DA TEMPERATURA EM MICRORGANISMOS	28
2.8.1.1 Microrganismos Psicrófilos	30
2.8.1.2 Microrganismos Mesófilos	31

2.8.1.3	Microrganismos Termófilos	31
2.8.1.4	Microrganismos Hipertermófilos	31
2.8.2	EFEITO DA PRESSÃO EM MICRORGANISMOS	32
2.9	CINÉTICA DE INATIVAÇÃO MICROBIANA	34
2.10	CONTROLO DO CRESCIMENTO MICROBIANO	35
2.10.1	ESTERILIZAÇÃO POR CALOR	35
2.10.2	ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	LEVEDURA <i>PICHIA STIPITIS</i> E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO	39
3.2	ASSEPSIA E AMOSTRAGEM	39
3.2.1	ASSEPSIA	39
3.2.2	AMOSTRAGEM	39
3.3	MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO	40
3.3.1	FERMENTAÇÕES EM MEIO SÓLIDO	40
3.3.2	FERMENTAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	40
3.3.3	CURVA DE CRESCIMENTO	40
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	41
3.4.1	CONTAGEM DOS MICRORGANISMOS	41
3.4.1.1	Contagem dos microrganismos em placas de Petri	41
3.4.1.2	Contagem dos microrganismos por câmara de Neubauer	41
3.4.2	DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	42
3.4.2.1	Método gravimétrico	42
3.4.2.2	Método turbidimétrico	42
3.5	ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA	42
3.6	ESTUDO DA ESTABILIDADE BÁRICA	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	ANÁLISE DOS PARÂMETROS PARA OPTIMIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO CELULAR	49
4.1.1	RECTAS DE CALIBRAÇÃO	49
4.1.1.1	Concentração de Biomassa	49
4.1.1.2	Unidade formadora de colónias por mililitro	50

4.1.1.3	Número de microrganismos totais por mililitro por contagem em câmara de Neubauer	52
4.1.2	CURVAS DE CRESCIMENTO	54
4.1.3	COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALISADOS	57
4.2	ESTABILIDADE TÉRMICA	60
4.2.1	EFEITO DA TEMPERATURA NA INACTIVAÇÃO DA LEVEDURA <i>P. STIPITIS</i>	60
4.2.2	ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^0	60
4.2.3	ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-2}	63
4.2.4	ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-4}	66
4.2.5	RESUMO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i>	68
4.2.6	ENERGIA DE ACTIVAÇÃO DE MORTE TÉRMICA	69
4.3	ESTABILIDADE BÁRICA	70
4.3.1	EFEITO DA PRESSÃO NA INACTIVAÇÃO DA LEVEDURA <i>P. STIPITIS</i>	70
4.3.2	ESTABILIDADE BÁRICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-2}	72
4.3.3	RESUMO DA ESTABILIDADE BÁRICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-2}	76
4.3.4	VOLUME DE ACTIVAÇÃO	77
5.	CONCLUSÃO E PROPOSTAS FUTURAS	79
6.	BIBLIOGRAFIA	83
7.	ANEXO	89
7.1	RECTAS DE CALIBRAÇÃO	91
7.1.1	[BIOMASSA]	91
7.2	CURVAS DE CRESCIMENTO	92
7.3	ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^0	95
7.4	ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-2}	96
7.5	ESTABILIDADE TÉRMICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-4}	97
7.6	EFEITO DA PRESSÃO NA INACTIVAÇÃO DA LEVEDURA <i>P. STIPITIS</i>	98
7.7	ESTABILIDADE BÁRICA DE <i>P. STIPITIS</i> NA DILUIÇÃO DE 1×10^{-2}	99

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Constituintes ou precursores primários da matéria lenhocelulósica</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2 – Produção de etanol a partir de material lenhocelulósico</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3 – Ciclo da divisão celular</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4 – Pichia stipitis.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5 – Conversão da xilose a etanol.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 6 – Reacções intermediárias das vias da pentose-fosfato, Embden-Meyerhof e fermentação alcoólica</i>	<i>17</i>
<i>Figura 7 – Representação do ciclo de crescimento.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 8 – Crescimento exponencial de microrganismos unicelulares</i>	<i>23</i>
<i>Figura 9 – a) Câmara de Neubauer; b) Visualização pormenorizada da câmara de Neubauer</i>	<i>25</i>
<i>Figura 10 – Ilustração das técnicas por esfregaço e incorporação.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 11 – Classificação de microrganismos segundo a temperatura</i>	<i>30</i>
<i>Figura 12 – Classificação de microrganismos segundo a pressão</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13 – Sistema de autoclave</i>	<i>36</i>
<i>Figura 14 – Esquema ilustrativo do trabalho desenvolvido.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 15 – Recta de calibração final entre a densidade óptica e a concentração da biomassa.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 16 – Recta de calibração entre a concentração da biomassa e unidade formadora de colónias.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 17 – Recta de calibração entre a densidade óptica e unidade formadora de colónias.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 18 – Recta de calibração entre a densidade óptica e o número de microrganismos totais.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 19 - Recta de calibração entre a concentração da biomassa e o número de microrganismo totais</i>	<i>54</i>
<i>Figura 20 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural da densidade óptica.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 21 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural da unidade formadora de colónias.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural da concentração de biomassa.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 23 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural do número de microrganismos totais.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 24 – Curva de crescimento: relação entre a densidade óptica e a unidade formadora de colónias.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 25 – Gráfico comparativo da unidade formadora de colónias obtido e calculado.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 26 – Gráfico da estabilidade térmica de P. stipitis na diluição de 1×10^0</i>	<i>62</i>
<i>Figura 27 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^0</i>	<i>63</i>
<i>Figura 28 – Gráfico da estabilidade térmica de P. stipitis na diluição de 1×10^{-2}</i>	<i>65</i>
<i>Figura 29 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^{-2}</i>	<i>65</i>
<i>Figura 30 – Gráfico da estabilidade térmica de P. stipitis na diluição de 1×10^{-4}</i>	<i>67</i>
<i>Figura 31 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^{-4}</i>	<i>67</i>
<i>Figura 32 – Gráfico da energia de activação de morte térmica</i>	<i>70</i>
<i>Figura 33 – Gráfico da estabilidade bária de P. stipitis nas diluições de 1×10^0, 1×10^{-2} e 1×10^{-4}</i>	<i>72</i>
<i>Figura 34 – Gráfico da estabilidade bária de P. stipitis na diluição de 1×10^{-2}</i>	<i>75</i>
<i>Figura 35 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^{-2}</i>	<i>76</i>
<i>Figura 36 – Gráfico do volume de activação</i>	<i>77</i>
<i>Figura 37 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural da densidade óptica</i>	<i>93</i>
<i>Figura 38 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural da concentração da biomassa.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 39 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural da unidade formadora de colónias.....</i>	<i>94</i>

Figura 40 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural do número de microrganismos totais.....	94
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das unidades formadoras de colónias, da concentração de biomassa e da densidade óptica.	51
Tabela 2 – Resultados do número de microrganismos totais, da densidade óptica e da concentração de biomassa.	53
Tabela 3 – Resultados das curvas de crescimento obtidas.....	57
Tabela 4 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à temperatura	59
Tabela 5 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 35,0 °C na diluição de 1×10^0	61
Tabela 6 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 37,5 °C na diluição de 1×10^0	61
Tabela 7 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^0	61
Tabela 8 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^0	62
Tabela 9 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^0	62
Tabela 10 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-2}	64
Tabela 11 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-2}	64
Tabela 12 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-2}	64
Tabela 13 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-4}	66
Tabela 14 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-4}	66
Tabela 15 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-4}	66
Tabela 16 – Resumo dos resultados da estabilidade térmica de <i>P. stipitis</i>	68
Tabela 17 – Determinação de parâmetros associados à energia de activação de morte térmica	69
Tabela 18 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^0	71
Tabela 19 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-2}	71
Tabela 20 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-4}	71
Tabela 21 – Número de microrganismos iniciais para o estudo da estabilidade bária das várias pressões.....	73
Tabela 22 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 50MPa na diluição de 1×10^{-2}	73
Tabela 23 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 100MPa na diluição de 1×10^{-2}	74
Tabela 24 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 125MPa na diluição de 1×10^{-2}	74
Tabela 25 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 150MPa na diluição de 1×10^{-2}	74
Tabela 26 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 175MPa na diluição de 1×10^{-2}	74
Tabela 27 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 200MPa na diluição de 1×10^{-2}	74
Tabela 28 – Resumo dos resultados da estabilidade bária de <i>P. stipitis</i>	76
Tabela 29 – Determinação de parâmetros associados ao volume de activação	77
Tabela 30 – Resultados da concentração de biomassa e densidade óptica associados à primeira recta de calibração	91
Tabela 31 – Resultados da concentração de biomassa e densidade óptica associados à segunda recta de calibração	92
Tabela 32 – Resultados ao longo do tempo associados à curva de crescimento	92
Tabela 33 – Logaritmo natural dos parâmetros associados à curva de crescimento.....	93
Tabela 34 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 35,0 °C na diluição de 1×10^0	95

<i>Tabela 35– Resultados das unidades formadoras de coloniais a 37,5 °C na diluição de 1×10^0</i>	95
<i>Tabela 36– Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^0</i>	95
<i>Tabela 37 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^0</i>	96
<i>Tabela 38– Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^0</i>	96
<i>Tabela 39 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-2}</i>	96
<i>Tabela 40– Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-2}</i>	97
<i>Tabela 41 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-2}</i>	97
<i>Tabela 42 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-4}</i>	97
<i>Tabela 43 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-4}</i>	98
<i>Tabela 44 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-4}</i>	98
<i>Tabela 45 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^0</i>	98
<i>Tabela 46 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-2}</i>	98
<i>Tabela 47 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-4}</i>	99
<i>Tabela 48 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 50MPa na diluição de 1×10^{-2}</i>	99
<i>Tabela 49 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 100MPa na diluição de 1×10^{-2}</i>	99
<i>Tabela 50 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 125MPa na diluição de 1×10^{-2}</i>	99
<i>Tabela 51 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 150MPa na diluição de 1×10^{-2}</i>	100
<i>Tabela 52 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 175MPa na diluição de 1×10^{-2}</i>	100
<i>Tabela 53 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 200MPa na diluição de 1×10^{-2}</i>	100

NOMENCLATURA

λ	– Comprimento de onda (nm);
μ	– Taxa específica de crescimento (h^{-1});
\pm	– mais ou menos;
A	– Factor pré-exponencial;
$[Biomassa]$	– concentração de biomassa (g/L);
CFU	– Unidade formadora de colónias (<i>Colony-forming units</i>);
cm^3	– centímetro cúbico;
$D. O.$	– Densidade óptica;
D_{10}	– tempo de redução decimal (min);
E_d	– Energia de activação de morte (J/mol);
<i>et. al</i>	– e colaboradores;
g	– grama;
g/L	– grama por litro;
h	– hora;
J	– Joule;
K	– Kelvin;
kd	– Taxa específica de morte (min^{-1});
L	– litro;
min	– minuto;
mol	– mole;
MPa	– mega Pascal;
N	– número de microrganismos sobreviventes (CFU/mL);
N_0	– número de microrganismos inicial (CFU/mL);
nm	– nanómetro;
NMT	– Número de microrganismos totais
P	– Pressão (MPa);
R	– Constante universal dos gases (J/mol K ou $\text{MPa cm}^3/\text{mol K}$);
T	– Temperatura (Kelvin);

$t_{1/2}$	– tempo de meia-vida (min);
V_a	– volume de activação (cm ³ /mol);
x	– concentração celular (g/L);
YM	– Yeast medium.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos na indústria para a produção de bioplásticos e/ou biocombustíveis tem sido cada vez mais usada nos dias que decorrem. Os microrganismos despertam interesse em diversas áreas, quer ao nível da engenharia química, quer ao nível da biotecnologia. Os microrganismos estão envolvidos em bioprocessos que procuram obter bioprodutos de utilidade pública a partir de subprodutos ou outros materiais de baixo valor. A levedura *Pichia stipitis* apresenta grande relevância e interesse para a produção de bioetanol, tendo como base um subproduto da indústria papaleira rico em xilose.

O objectivo deste trabalho é estudar a estabilidade da levedura *P. stipitis* em condições extremas de temperatura e de pressão. Ao manusear microrganismos em biorefinarias, a indústria permanece muito dependente da estabilidade térmica e bária. Na literatura existem poucas referências relativas ao estudo do comportamento da levedura *P. stipitis* em diferentes condições experimentais. Consequentemente, não existem dados relativos à estabilidade térmica e bária da levedura *P. stipitis*, pelo que este estudo poderá tornar-se bastante útil para aplicações industriais da *P. stipitis* na produção de bioetanol. A utilização de elevadas pressões tem sido cada vez mais explorada em processos biotecnológicos, sendo um tema de crescente interesse nos últimos anos. A inactivação bária da levedura *P. stipitis* poderá ser usada para terminar o crescimento da levedura, quando já se atingiu a concentração máxima de etanol. Será conveniente inactivar a levedura nesta altura, pois ela poderá ser responsável por oxidação posterior, do próprio etanol, obtendo-se ácido acético como produto final. A inactivação térmica poderá também ser usada se combinada com a extração do etanol por evaporação. Pelo que foi exposto, é pertinente estudar a inactivação térmica e bária para obter informação sobre a cinética e sobrevivência da levedura *P. stipitis*.

Numa fase inicial do trabalho em cultura descontínua, determinaram-se a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação e realizaram-se diferentes rectas de calibração associadas ao crescimento da levedura. Posteriormente, procurou-se a determinação de métodos simples, para a contagem dos microrganismos e a determinação das gamas de temperatura e pressão a utilizar nas inactivações. Por fim, foram realizados testes associados à estabilidade térmica e bária da levedura e determinaram-se os parâmetros característicos, nomeadamente, o tempo de meia-

—INTRODUÇÃO—

vida, o tempo de redução decimal, a energia de activação e o volume de activação da inactivação por temperatura e pressão, respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Recursos Renováveis

Existe uma necessidade crescente de encontrar produtos substituintes do petróleo, um recurso não renovável, para o fabrico de combustíveis e produtos químicos (Chundawat *et al.* 2007). As tecnologias de refinaria da biomassa tornaram-se matéria de investigação e desenvolvimento ao longo dos tempos. Foram desenvolvidas muitas tecnologias híbridas a partir de várias áreas científicas, como a bioengenharia, a química de polímeros, a ciência dos alimentos, a agricultura, entre outras. Actualmente, os sistemas de biorefinarias a partir de cereais e compostos lenhocelulósicos são áreas em desenvolvimento, focando-se na produção de combustíveis, solventes, produtos químicos, polímeros e alimentos para o consumo humano (Kamm *et al.* 2006). A produção de etanol em grandes quantidades a partir de recursos naturais, como o milho e cana de açúcar, é um dos exemplos destes sistemas (Chundawat *et al.* 2007).

O desenvolvimento de biorefinarias, adjacentes aos recursos renováveis, representa a chave para a produção produtos químicos, materiais, mercadorias e combustíveis. A investigação e o desenvolvimento de novos sistemas de biorefinarias são mais abundantes na Europa. Existem regulamentações em vigor com vista à crescente substituição de recursos não renováveis por biomassa, na área dos biocombustíveis (Kamm e Kamm 2004).

Actualmente, existem três sistemas de biorefinarias: “*Biorefinaria de cultura completa*” (Whole Crop Biorefinery); “*Biorefinaria verde*” (Green biorefinery); e “*Biorefinaria de materiais lenhocelulósicos*” (Lignocellulose Feedstock Biorefinery) (Kamm e Kamm 2004). Os três sistemas de biorefinarias mencionados, evoluem com base na natureza da matéria prima, competindo com o preço dos derivados do petróleo para a produção de combustível, compostos químicos e materiais poliméricos (Kamm *et al.* 2006).

2.1.1 Biorefinaria de cultura completa – “Whole Crop Biorefinery”

As matérias primas da biorefinaria de cultura completa são os cereais, entre os quais o centeio, trigo, triticale e milho. O primeiro passo é a separação mecânica do cereal em grão e palha. Por sua vez, a palha pode ser separada em celulose, hemicelulose e lenhina para futuras conversões e produção de produtos pela via da biorefinaria de materiais lenhocelulósicos. O cereal pode ser convertido em amido ou, através da moagem, em farinha. Futuramente, o tratamento da farinha será conduzido por quatro processos: fracionamento; hidrólise; modificação química; e conversão biotecnológica via glicólise (Kamm e Kamm 2004).

2.1.2 Biorefinaria verde – “Green biorefinery”

A matéria prima da biorefinaria verde é a erva de cultivo terrestre em terrenos limitados e reservas naturais. Desta maneira, estas plantas verdes representam uma fonte de reacções químicas naturais. A tecnologia adequada de fracionamento é o primeiro passo a usar para isolar o conteúdo da cultura verde (Kamm e Kamm 2004). Assim, a cultura verde é separada num bolo prensado, rico em fibra e num sumo verde, rico em nutrientes e em água. O bolo prensado contém celulose, corantes, pigmentos valiosos e outros compostos orgânicos e o sumo verde contém proteínas, aminoácidos livres, corantes, enzimas, hormonas e minerais. A aplicação de métodos biotecnológicos para a conversão dos compostos mencionados é acompanhada em simultâneo com o tratamento da água, existindo a necessidade de processamentos rápidos e primários ou a utilização de métodos de conservação (selagem ou secagem), para a preservação do conteúdo da cultura verde (Kamm *et al.* 2006).

Partindo do sumo verde, o principal interesse é a produção de produtos como o ácido láctico, etanol, aminoácidos e proteínas. O bolo prensado pode ser utilizado como matéria prima para a conversão em hidrocarbonetos (biocombustíveis sintéticos) ou para a produção de produtos químicos, como o ácido levulínico (Kamm e Kamm 2004). As vantagens da biorefinaria verde são a obtenção de elevadas

quantidades de biomassa por hectare, o bom acoplamento com a produção agrícola e o baixo preço das matérias primas (Kamm *et al.* 2006).

2.1.3 Biorefinaria de materiais lenhocelulósicos – “Lignocellulose Feedstock Biorefinery”

Entre as biorefinarias com grandes potencialidades, a biorefinaria de materiais lenhocelulósicos é provavelmente o sistema de maior sucesso. A matéria prima é ótima e de fácil obtenção (palha, madeira, resíduos de papel, etc), por outro lado, a conversão dos produtos tem uma boa posição no mercado sobre o sistema tradicional da petroquímica. Os materiais lenhocelulósicos são constituídos por três fracções químicas ou precursores primários: 1) hemicelulose/polioses, mistura de polímeros polissacáridos de baixa massa molecular, com predominância de xilose, arabinose, glucose, galactose, manose e ácido urânico; 2) celulose, um polissacarídeo constituído por unidades de glucose; e 3) lenhina, um polímero fenólico (Figura 1 e Figura 2) (Palmqvist e Hahn-Hägerdal 2000; Kamm *et al.* 2006).

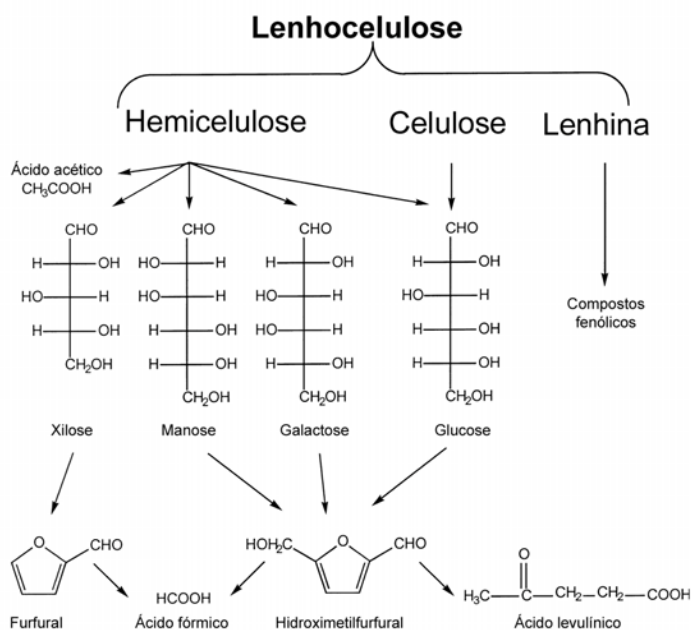


Figura 1 – Constituintes ou precursores primários da matéria lenhocelulósica
(Adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal 2000)

Um processo atractivo neste sistema é a hidrólise de materiais lenhocelulósicos, que leva à formação de glucose, xilose e etanol. Existem certas leveduras que conseguem, utilizar a glucose e/ou xilose para produzir etanol, por fermentação alcoólica (Figura 2) (Kamm *et al.* 2006).

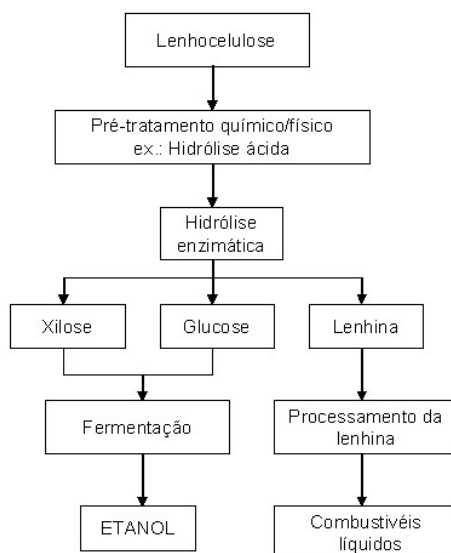
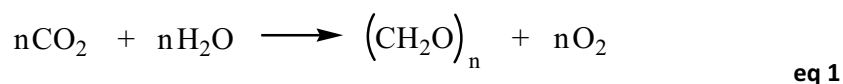


Figura 2 – Produção de etanol a partir de material lenhocelulósico
(Adaptado de Aristidou e Penttilä 2000)

2.2 Biomassa vegetal

A natureza é um sistema permanente na renovação de matérias primas para produção de materiais, compostos químicos, combustíveis, cosméticos e produtos farmacêuticos. A utilização de matérias primas a partir da agricultura e das florestas é apenas o início para a produção de bioprodutos. Grande parte dos bioprodutos da indústria são resultados directos de tratamentos físicos ou químicos e de processamentos da biomassa (processamento de celulose, amido, óleos, proteínas, lenhina e terpenos). A reacção básica da biomassa é a fotossíntese, de acordo com a eq 1 (Kamm *et al.* 2006).



Existem várias definições do termo “biomassa”: toda a matéria orgânica viva no nosso sistema ecológico; matéria vegetal constantemente produzida pela fotossíntese; e massa de microrganismos, animais e plantas usadas como matéria prima no processo

microbiológico (Kamm *et al.* 2006). Desta forma, o programa de investigação e desenvolvimento da biomassa (*Biomass Research and Development*) definiu, recentemente, o termo biomassa como “qualquer matéria orgânica que está disponível em bases renováveis ou recorrentes, incluindo as culturas energéticas e árvores, plantas agrícolas alimentares e resíduos vegetais para alimentação de animais, plantas aquáticas, madeira e resíduos de madeira, resíduos de animais e outros materiais de desperdício” (U.S. 2000).

A biomassa resulta do desempenho da natureza, sendo produzida na agricultura e na floresta por sistemas biológicos, e apresenta uma razão de carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto (C:H:O:N) diferente do petróleo. Assim, a biomassa pode ser modificada e adaptada à finalidade do tratamento e processo. A biomassa tem uma composição complexa, um passo necessário é a sua separação em grupos principais, cujo tratamento e processo origina uma grande variedade de produtos (Kamm *et al.* 2006).

A biomassa proveniente das plantas consiste em produtos básicos de hidratos de carbono, lenhina, proteína, lípidos, vitaminas, corantes e essências aromáticas de estrutura química complexa. Portanto, a biorefinaria combina tecnologias essenciais que transformam as matérias primas biológicas em intermediários e produtos finais. Actualmente, e numa fase inicial do processamento, realiza-se uma técnica de separação viável, permitindo o tratamento de todos os compostos básicos. Para a produção anual de biomassa, estimam-se 75% de hidratos de carbono, sob a forma de celulose, amido e sacarose, 20% de lenhina e 5% de outros compostos naturais (óleos e proteínas). A principal atenção centra-se na forma eficiente de aceder aos hidratos de carbono e posteriormente à sua conversão em produtos químicos e correspondentes produtos finais. Entre outros hidratos de carbono, a glucose é um bom reagente tanto para métodos microbiológicos como químicos, sendo o ponto de partida para a produção de uma ampla gama de produtos biotecnológicos ou químicos. A extensão de conversão microbiana, a partir da glucose, é elevada e as reações são energeticamente rentáveis (Aristidou e Penttilä 2000; Kamm *et al.* 2006).

2.2.1 Biomassa vegetal hidrolisada como fonte de carbono fermentável por microrganismo

O uso da fermentação de microrganismos para converter açúcares em produtos comerciais ou intermediários, tem sido explorado com sucesso durante muitos anos. Estes processos fermentativos são baseados na utilização de fluxos de carbono, relativamente limpos, contendo poucas impurezas. Após o pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica e da sua hidrólise ácida, obtém-se uma mistura de hexoses, pentoses e subprodutos (furfural, hidroximetilfurfural e fenóis). Estes subprodutos são conhecidos por inibirem o processo fermentativo, diminuindo o crescimento celular. Para evitar a inibição, devem-se diluir os hidrolisados, alimentar os microrganismos durante a fermentação ou usar enzimas celulolíticas, reduzindo a quantidade total de biomassa hidrolisada que pode ser utilizada por unidade de tempo ou de volume (Palmqvist e Hahn-Hägerdal 2000; Liu *et al.* 2005; Kamm *et al.* 2006; Agbogbo *et al.* 2008). Por outro lado, o impacto de subprodutos na fermentação pode ser menos severo, porque não se inibe totalmente o crescimento de microrganismos, mas há um efeito negativo no comportamento das células. Por exemplo, os ácidos orgânicos, ácido fórmico e ácido acético acima de determinadas concentrações, possuem um efeito negativo na fisiologia da célula, aumentando a energia necessária para o microrganismo desempenhar as suas funções habituais de manutenção celular. Este crescimento na energia consumida é refletido em elevados consumos de carbono proveniente dos açúcares, com um decréscimo do rendimento final de produto por unidade de biomassa. A célula sofre stress osmótico com elevadas concentrações de açúcar e, dependendo da concentração de açúcar, poderá haver inibição do crescimento celular ou aumento da manutenção celular (Kamm *et al.* 2006).

O processo biológico utiliza substratos lenhocelulósicos para produção de etanol, como demonstra a Figura 1, através de três passos: a deslignificação para libertação da celulose e hemicelulose do sistema complexo da lenhina; a hidrólise dos polímeros de hidratos de carbono, a celulose e a hemicelulose, para a produção de açúcares livres; e a fermentação microbiana da mistura de hexoses e pentoses para a produção de etanol (Aristidou e Penttilä 2000).

A fermentação de glucose, hexose proveniente da hidrólise da celulose, a etanol pode ser realizada de forma eficiente. Por outro lado, a conversão de xilose, pentose principal do hidrolisado de hemicelulose, a etanol apresenta um desafio bioquímico, especialmente se a glucose estiver presente, para tornar o processo economicamente viável. A eficiência da fermentação de xilose e outros constituintes da hemicelulose pode revelar-se essencial para o desenvolvimento de um processo economicamente viável, na produção de etanol a partir de biomassa vegetal (Aristidou e Penttilä 2000).

2.3 Microrganismos

Os microrganismos são seres vivos de dimensões reduzidas. Porém, a sua biomassa na terra é elevada, mesmo quando comparada com a biomassa de organismos vivos maiores. O estudo de compostos naturais, como a água e a terra, apresenta sempre a presença de células microbianas. Estas pequenas células microbianas têm a capacidade de se multiplicar a uma velocidade rápida, produzindo populações de grande escala e podem ter um grande efeito no habitat. Desta maneira, os microrganismos são extrema e quantitativamente importantes para vários ecossistemas (Madigan 2006).

2.3.1 Fungos unicelulares – leveduras

As leveduras são fungos unicelulares. As suas células são tipicamente esféricas, ovais ou cilíndricas e a divisão celular, normalmente, ocorre por um processo de gemulação (reprodução assexuada). A nova célula forma-se a partir da célula mãe, através de mitose que gradualmente cresce e separa-se da célula mãe. A reprodução assexuada está representada na Figura 3 (Waites 2001; Madigan 2006).

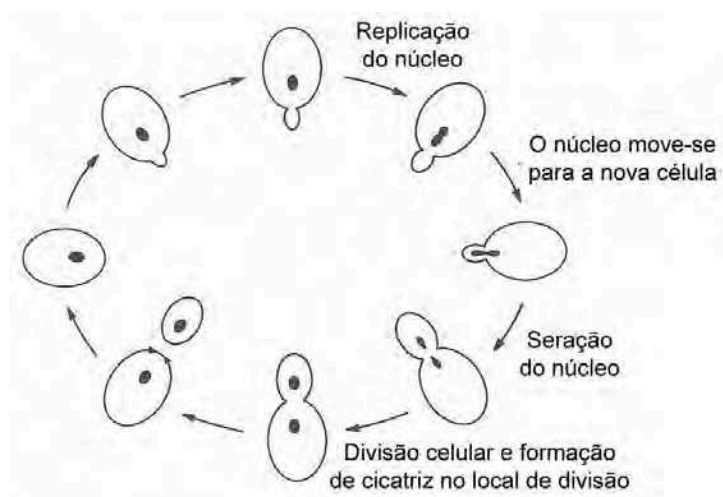


Figura 3 – Ciclo da divisão celular

(Adaptado de Michael L. Shuler e Kargi 2001)

Segundo a fonte de energia e em termos metabólicos, as leveduras são tipicamente classificadas como quimiorganotróficos, usando matéria orgânica como fonte de energia. As leveduras crescem em habitats onde há presença de açúcares, encontrados em frutas, flores e cascas de árvores (Madigan 2006).

2.3.2 *Pichia stipitis*

Pichia stipitis pertence a um grupo de leveduras isoladas existentes na madeira decadente e nas larvas de insetos que aí habitam. Esta levedura tem a capacidade de utilizar a maior parte dos açúcares presentes na madeira, porque produz diversas celulasas e hemicelulasas para hidrolizar os polissacáridos da madeira em monossacáridos. Uma destas enzimas é a β -glucosidase que cliva a ligação glicolítica da celobiose em monómeros de glucose. A *P. stipitis* tem a capacidade de metabolizar a celobiose, glucose, xilose, manose e galactose, apresentando uma grande capacidade de produção de biomassa (Agbogbo e Coward-Kelly 2008).

A temperatura ótima para o crescimento de *P. stipitis*, em meio sólido, é entre 25 e 33°C, a um pH ótimo entre 4,5 e 5,5 (Agbogbo e Coward-Kelly 2008). O crescimento da levedura apresenta uma cor creme brilhante, em forma circular ligeiramente enrugada (Figura 4a). As células de *P. stipitis* apresentam formas

esféricas, alongadas ou elípticas, com cerca de $(2,2 - 4,5) \times (2,5 - 6,0) \mu\text{m}$ (Figura 4b), apresentando uma reprodução assexuada por gemulação lateral (Kurtzman 1996).

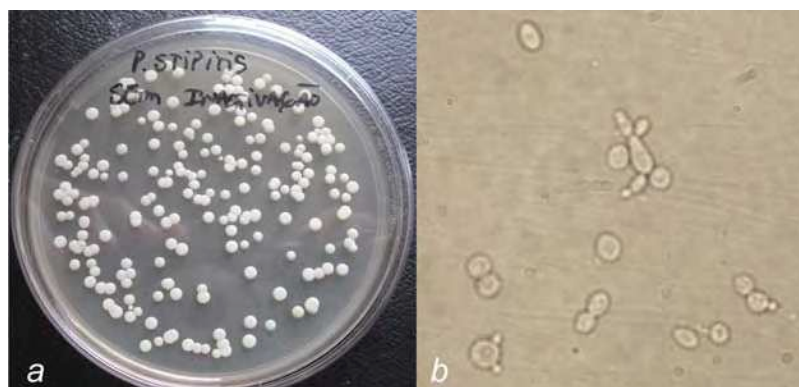


Figura 4 – *Pichia stipitis*.

a) Observação em placa de Petri (meio sólido).

b) Observação em microscópio óptico com ampliação de 1000×

O oxigénio desempenha um papel importante no crescimento celular, pois a *P. stipitis* é uma levedura aeróbica, não produzindo etanol, nem crescendo, sob condições estritamente anaeróbicas, mesmo que a presença de açúcares seja elevada. A escolha de produzir etanol ou biomassa celular, através de *P. stipitis*, depende do oxigénio fornecido às células. A elevadas taxas de oxigénio é produzida apenas biomassa celular, por outro lado, a baixas taxas apenas é produzido etanol (Nian-Qing *et al.* 1999; Agbogbo e Coward-Kelly 2008).

O crescimento de certas leveduras é inibido na presença de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (Liu *et al.* 2005; Agbogbo *et al.* 2008). No entanto, existem algumas estirpes de *P. stipitis* resultantes de selecção dirigida, que têm a capacidade de biotransformar o furfural em álcool furfurílico e o hidroximetilfurfural em 2,5-bis-hidroximetilfurano, permitindo assim a produção de bioetanol mesmo quando existem estes inibidores (Liu *et al.* 2005). Deste modo, a *P. stipitis* tem certas qualidades únicas, apresentando grande potencial, como desintoxicante in situ de matérias primas lenhocelulósicas, uma vez que promove a redução da concentração dos inibidores produzidos durante o pré-tratamento da biomassa vegetal e simultaneamente é agente da fermentação dos açúcares hexoses e pentoses a etanol (Agbogbo e Coward-Kelly 2008).

2.3.3 Fermentação de pentoses

Os microrganismos devem ser capazes de fermentar todos os monossacarídeos presentes na biomassa e resistir a potenciais inibidores do hidrolisado (Aristidou e Penttilä 2000). A levedura *Pichia stipitis* é um dos poucos microrganismos capaz de fermentar subprodutos ricos em pentoses, especialmente a xilose, sendo uma levedura promissora entre os vários microrganismos (Aristidou e Penttilä 2000; Agbogbo *et al.* 2006). A metabolização de xilose a etanol está representada na Figura 5 (Aristidou e Penttilä 2000).

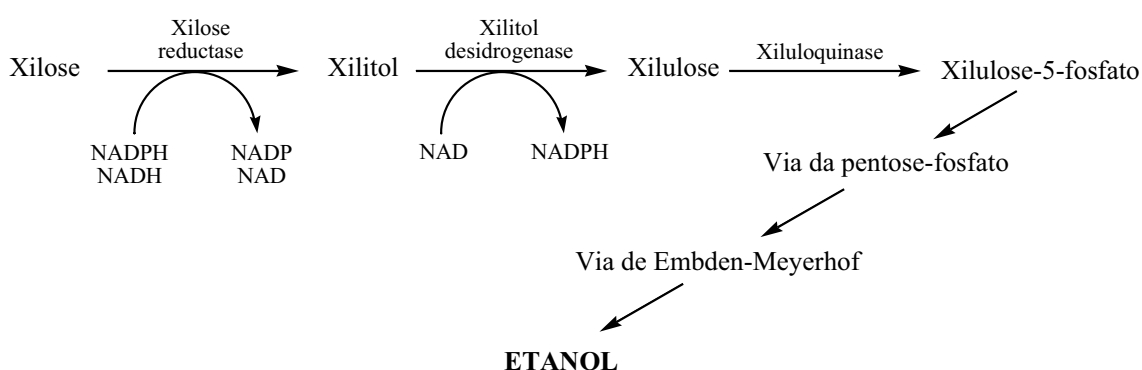


Figura 5 – Conversão da xilose a etanol
(Adaptado de Aristidou e Penttilä 2000)

A reacção, nas duas etapas iniciais, envolve as enzimas xilose reductase e xilitol desidrogenase, normalmente encontradas na levedura *P. stipitis*, para a conversão de xilose a xilulose. A xilulose é posteriormente fosforilada pela xiluloquinase a xilulose-5-fosfato. Através das vias da pentose-fosfato, Embden-Meyerhof e fermentação alcoólica (Figura 6), a xilulose-5-fosfato é catabolizada a etanol (Aristidou e Penttilä 2000).

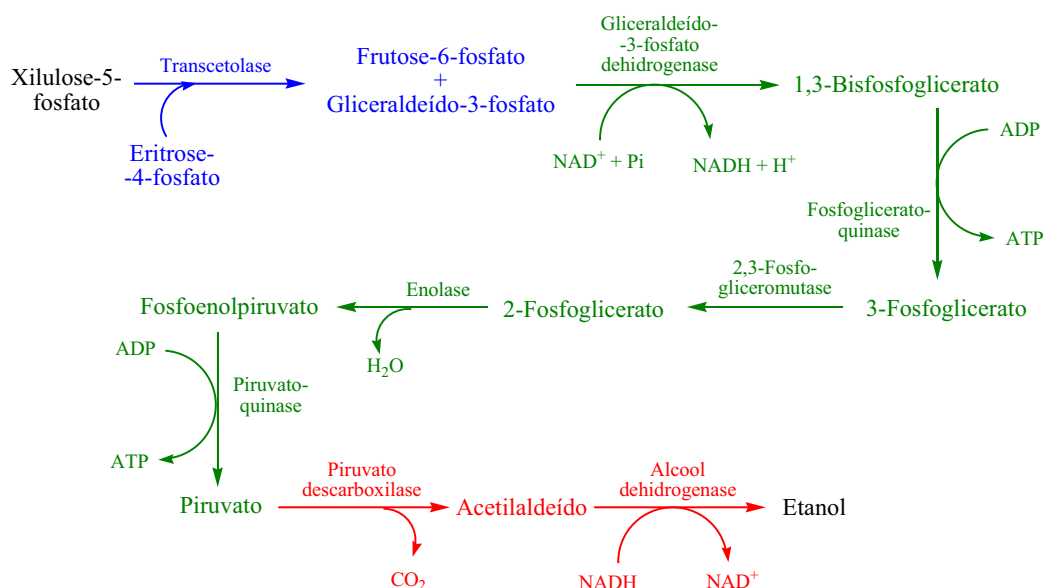


Figura 6 – Reações intermediárias das vias da pentose-fosfato, Embden-Meyerhof e fermentação alcoólica (Adaptado de Lehninger *et al.* 2005)

Porém, como mencionado anteriormente, algumas leveduras são limitadas na fermentação de pentoses, apresentando rendimentos fracos na produção de etanol em comparação com leveduras capazes de fermentar hexoses. Assim, de modo a prevenir baixos rendimentos, há já quem use a engenharia genética em leveduras, ou seja, manipula-se o genoma da levedura de maneira a melhorar a velocidade e a eficiência da produção de etanol, a partir de pentoses (Aristidou e Penttila 2000).

2.4 Nutrição microbiana

A biossíntese de componentes celulares necessários para o crescimento, reprodução e manutenção microbiana, requer o abastecimento de uma fonte de energia e nutrientes básicos (Waites 2001). A célula pode obter a maior parte das micromoléculas que precisa, em condições pré-formadas do ambiente ou pode biosintetizá-las a partir de moléculas mais simples. As macromoléculas, pelo contrário, são sempre sintetizadas na célula. Assim, as células dos microrganismos contêm uma quantidade grande de micro e macromoléculas (Madigan 2006).

Toda a biomassa constituída por células é composta essencialmente por quatro tipos de átomos: *carbono* (C), *oxigénio* (O), *hidrogénio* (H) e *azoto* (N). Estes quatro elementos compõem a base principal de pequenas e grandes moléculas. Existe uma série de outros elementos menos abundantes também importantes para o

metabolismo da célula. Esses elementos incluem o *fósforo* (P), *potássio* (K), *cálcio* (Ca), *magnésio* (Mg), *enxofre* (S), *ferro* (Fe), *zinco* (Zn), *manganês* (Mn), *cobre* (Cu), *cobalto* (Co), entre outros (Madigan 2006).

A quantidade de água no peso húmido da célula é cerca de 90%. No entanto, as macromoléculas representam a maior parte do peso seco da célula, sendo a mesma constituída por elementos químicos provenientes dos nutrientes. Os nutrientes que entram na célula são consumidos e passam a fazer parte dos constituintes das células (Madigan 2006). Alguns nutrientes são absorvidos por *difusão passiva*, onde a absorção não requer sistemas de transporte. Estes nutrientes são usualmente solúveis em lípidos e conseguem entrar por uma membrana hidrofóbica. No entanto, este é um mecanismo ineficaz, uma vez que a taxa de absorção depende do gradiente de concentração através da membrana. A maioria dos nutrientes absorvidos não é solúvel em lípidos e envolve uma proteína transportadora (permease), que expande a membrana. A *difusão facilitada* é um sistema de absorção que envolve uma proteína transportadora, com a função de canal transportador, e não requer nenhum fluxo directo de energia, pois é conduzida unicamente pelo gradiente de concentração através da membrana. Porém, a absorção de nutrientes é contínua, porque a concentração intracelular não aumenta uma vez que os nutrientes são constantemente metabolizados. Um outro sistema envolvendo uma proteína transportadora é o *transporte activo*. Este mecanismo de transporte permite a acumulação de nutrientes contra o gradiente de concentrações, o qual é importante em ambientes onde os níveis nutricionais são baixos. Contudo, este mecanismo requer um fluxo directo de quantidades substanciais de energia metabólica, ATP ou gradientes de prótons, para conduzir o transporte (Waites 2001). Os nutrientes podem ser divididos em duas classes: (1) macronutrientes, que são requeridos em grandes quantidades e (2) micronutrientes, que são requeridos em pequenas quantidades (Madigan 2006).

No interior dos microrganismos existe uma grande diversidade de reacções químicas e organizações moleculares em estruturas celulares específicas. O termo metabolismo é usado para referir todos os processos químicos que acontecem na célula. As reacções metabólicas podem libertar energia sob a forma de ATP e chamam-se de reacções catabólicas (catabolismo) ou podem converter os nutrientes vindos do

ambiente em componentes da célula, por meio das reacções anabólicas (anabolismo). Na célula, de acordo com os nutrientes e os factores ambientais a que está sujeita, há mecanismos metabólicos organizados, que permitem a sobrevivência do microrganismo. Assim e em termos metabólicos, os microorganismos são classificados em classes segundo a fonte de energia que usam. Todos os termos usados para descrever estas classes empregam o sufixo *trófico*. Os organismos que usam compostos químicos como fonte de energia são designados por *quimiotróficos* e os que usam luz são designados por *fototróficos*. A maioria dos microorganismos usa componentes orgânicos como fonte de energia, designados por *quimiorganotróficos* e outros usam uma fonte de componentes inorgânicos, designados por *quimiolitotróficos* (Madigan 2006).

2.5 Meios de cultura

Uma grande parte do estudo da microbiologia depende da capacidade do crescimento e sobrevivência microbiana. Este estudo apenas é possível se os meios de cultura forem adequados. O meio de cultura é uma preparação sólida ou líquida utilizada para armazenar e/ou levar ao crescimento os microrganismos. Para ser eficaz, o meio de cultura deve conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo em estudo. Existem meios especializados que são essenciais para o isolamento e identificação de microrganismos, para testar a sensibilidade de antibióticos, para analisar águas, alimentos ou diversas especificidades. Embora todos os microrganismos precisem de fontes de energia, a composição exacta de um bom meio de cultura dependerá da espécie do microrganismo. O conhecimento do habitat normal de um microrganismo é muitas vezes útil para a selecção de um meio de cultura adequado, que deve fornecer os requisitos nutricionais ao microrganismo. Frequentemente, o meio é usado para seleccionar e levar ao crescimento microrganismos específicos ou para ajudar a identificar uma determinada espécie. Para a preparação de um meio de cultura sólido é usado um meio líquido com a adição de 1,0 a 2,0% de agar. O agar é um polímero sulfatado, normalmente extraído de algas vermelhas e composto principalmente por D-galactose, 3,6-anidro-L-galactose e ácido D-glucurônico. O agar é um bom agente de solidificação, porque depois de ter sido gelificado em água a ferver, pode ser arrefecido até cerca de 40°C, antes de endurecer

e não irá fundir novamente até que a temperatura suba para cerca de 80 a 90° C. Também é um excelente agente de endurecimento que a maioria dos microrganismos não consegue degradar (Prescott 2002; Madigan 2006).

O meio de cultura usado para a levedura *P. stipitis* é um meio de cultura complexo, porque contém alguns ingredientes cuja composição química não é rigorosamente conhecida, como os extractos naturais, nomeadamente, extracto de levedura e extrato de maltose. Este meio é muito útil, pois é suficientemente rico e completo para satisfazer as necessidades nutricionais dos microorganismos. (Prescott 2002)

2.6 Crescimento de populações microbianas unicelulares

O crescimento é definido como o aumento do número de células microbianas numa população, mas também pode ser considerado como o aumento da massa microbiana. A taxa de crescimento é o aumento do número de células ou da massa de células por unidade de tempo. Durante o ciclo da divisão celular, todos os componentes da estrutura da célula são duplicados. A formação de duas células, a partir da célula mãe, é chamada de duplicação e o tempo requerido para ocorrer é denominado de tempo de duplicação (t_d) (Madigan 2006). Teoricamente, após uma geração, a população microbiana e a concentração de biomassa duplicam (Waites 2001).

A fermentação microbiana, em meio líquido, pode ser realizada sob diferentes condições de operação, ou seja, crescimento descontínuo (batch) ou crescimento contínuo. O crescimento descontínuo envolve um sistema fechado, onde todos os nutrientes estão presentes no início da fermentação, num volume de meio fixo. A fermentação contínua envolve um sistema aberto, que é alimentado continuamente com meio líquido fresco e de onde sai meio fermentado com um caudal equivalente ao da alimentação (Waites 2001).

2.6.1 Crescimento descontínuo

Durante a fermentação em crescimento descontínuo, a população microbiana atravessa várias fases distintas de crescimento: *lag*, *aceleração*, *exponencial*, *desaceleração*, *estacionária* e *de morte*. As várias fases mencionadas estão representadas na Figura 7 (Waites 2001).



Figura 7 – Representação do ciclo de crescimento

(Adaptado de Waites 2001)

Na fase lag não ocorre crescimento microbiano e a população microbiana permanece constante (Waites 2001). Quando uma população microbiana é inoculada num meio de cultura, o crescimento, normalmente, começa apenas depois de um certo período de tempo. Este intervalo pode ser breve ou extenso, dependendo das condições de viabilidade, concentração celular e morfologia do meio de cultura. É um período de actividade metabólica intensa à medida que o inóculo se adapta ao novo ambiente. Quando os microrganismos se encontram num novo meio de cultura, podem escassear as enzimas essenciais, as vitaminas, os cofactores, entre outros. Estes últimos podem ser sintetizados, usando os nutrientes disponíveis, de forma a promover a divisão celular. A fase lag também é observada quando as células sofrem traumas físicos (por choque térmico e radiações) e químicos (por produtos tóxicos) ou quando são transferidas de um meio rico para outro de composição mais pobre,

devido à necessidade de síntese de várias enzimas (Waites 2001; Madigan 2006). O stress fisiológico também pode ter algum efeito na fase lag, especialmente se as células são constantemente transferidas de um meio com baixa concentração de soluto (pressão osmótica baixa) para um meio novo com elevada concentração de soluto (pressão osmótica elevada). Geralmente, o inóculo preparado a partir de células recolhidas na fase exponencial (período de maior crescimento) apresenta uma fase lag mais curta (Waites 2001).

Uma vez que as células se encontram adaptadas ao seu novo ambiente, absorvendo e sintetizando os seus constituintes, entram na fase de aceleração. Ocorre o aumento da divisão celular, obtendo-se a taxa específica de crescimento (μ). Nesta altura começa a fase exponencial e o número de células/biomassa aumenta a um ritmo constante (Waites 2001; Madigan 2006), embora a quantidade de produtos finais do metabolismo ainda seja baixa (Madigan 2006).

A nível matemático, a biomassa pode ser expressa pela concentração celular (x) ou pelo número de células (N). Durante um pequeno intervalo de tempo finito (dt), a biomassa (dx) aumenta, para ser proporcional à quantidade (x) presente, num intervalo de tempo (Waites 2001). Assim, obtém-se a eq 2:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{eq 2}$$

onde x é a concentração celular (g/L), μ é a taxa específica de crescimento e t é o tempo (h). A eq 2 pode ser rearranjada para estimar a taxa específica de crescimento (μ) eq 3:

$$\mu = 1/x \times dx/dt \quad \text{eq 3}$$

Ao integrar a eq 2, durante qualquer período de crescimento exponencial, promove-se a eq 4:

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad \text{eq 4}$$

onde x_t é a concentração da biomassa no tempo t e x_0 é a concentração da biomassa no início do crescimento exponencial. Logaritmizando a eq 4 obtém-se:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad \text{eq 5}$$

A eq 5 é do tipo $y = b + mx$, onde o declive (m) equivale à taxa específica de crescimento. Através da eq 6 e Figura 8, a visualização da taxa específica de crescimento é melhorada.

$$\mu = (\ln x_t - \ln x_0)/t \quad \text{eq 6}$$

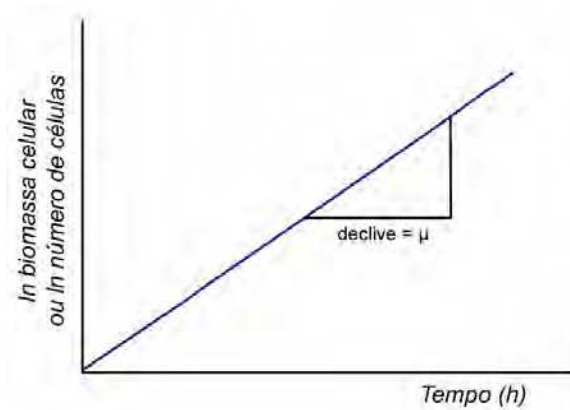


Figura 8 – Crescimento exponencial de microrganismos unicelulares
(Adaptado de Waites 2001)

Ao considerar a situação em que no tempo zero, a biomassa da célula equivale a x_0 e após um período de tempo fixo de crescimento exponencial, equivalente a um tempo de duplicação ($t = t_d$), a biomassa microbiana duplica para $2x_0$, obtemos a eq 7 com a substituição destes parâmetros na eq 4:

$$2x_0 = x_0 e^{\mu t_d} \quad \text{eq 7}$$

Logaritmando a eq 7 obtém-se:

$$\ln 2x_0 = \ln x_0 + \mu t_d \quad \text{eq 8}$$

ou

$$\mu t_d = \ln 2 \quad \text{eq 9}$$

Desta maneira e a partir da eq 9, pode-se calcular o tempo de duplicação (eq 10):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{eq 10}$$

Contudo, durante o crescimento descontínuo, os microrganismos metabolizam continuamente os nutrientes presentes no meio fermentativo. Após um certo tempo, o crescimento decresce ligeiramente e eventualmente termina. Esta diminuição de crescimento deve-se à redução de nutrientes essenciais (fontes de carbono, aminoácidos essenciais, etc) e/ou à formação de metabolitos tóxicos (ácido láctico, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, entre outros). A este nível, atinge-se o início da fase de desaceleração (Waites 2001).

Na fase estacionária, com os nutrientes a escassear ou com o aumento da produção de produtos tóxicos, não há crescimento da população microbiana, ou seja, o número de células que se dividem é equivalente ao número de células que morrem. Este fenómeno é designado por crescimento crítico (Madigan 2006). Contudo, os microrganismos ainda são metabolicamente activos, sintetizando vários metabolitos secundários, que incluem antibióticos e algumas enzimas. A duração da fase estacionária depende dos microrganismos envolvidos e das condições ambientais (Waites 2001; Madigan 2006).

Ao atingir a fase estacionária, as células podem permanecer vivas ou morrer. Contudo, se as células forem incapazes de sobreviver, o crescimento microbiano entra na fase de morte. Este processo é exponencial e em alguns casos é acompanhado de lise celular (Waites 2001; Madigan 2006).

2.7 Monitorização do crescimento microbiano

Durante a fermentação é necessário fazer a determinação da população microbiana, do número de células e/ou da concentração da biomassa. Existem vários métodos directos ou indirectos capazes de monitorar o crescimento de populações. Os métodos directos envolvem a determinação do peso seco, contagem de células por microscópio e contagem de células por colónias. Os métodos indirectos incluem a turbidimetria, a espectrometria, a análise dos componentes celulares (proteína, DNA, RNA e ATP) e monitorização directa da utilização de dióxido de carbono ou oxigénio. O método adoptado depende da fermentação e dos objectivos específicos, sendo considerados alguns factores, como o grau de precisão, a sensibilidade e a duração das análises. Além disso, o meio de cultura líquido pode variar na cor, viscosidade e quantidade de partículas sólidas, sendo estes factores também relevantes quanto à

escolha do método a usar. É de notar que estas determinações são principalmente direccionadas para microrganismos unicelulares, pois uma cultura em suspensão é homogénea durante e após a fermentação (Waites 2001; Prescott 2002; Madigan 2006).

2.7.1 Técnica de contagem por microscopia directa

O número de células de uma cultura em suspensão pode ser medido por contagem microscópica directa, usando câmaras de contagem do tipo de Neubauer (Figura 9a) ou Petroff-Hauser (Waites 2001; Prescott 2002).

Adiciona-se um volume fixo de determinada cultura à câmara de Neubauer e coloca-se uma lamela. Pela contagem do número de células dentro de uma parte da esquadria, determina-se o número de células por mililitro (Figura 9b). A contagem microscópica directa é rápida, mas para poder distinguir as células vivas das mortas, tem que se usar uma técnica de coloração. Além disso, as amostras devem ter uma concentração celular relativamente elevada (mínimo de 5×10^6 células/mL) (Waites 2001; Madigan 2006).

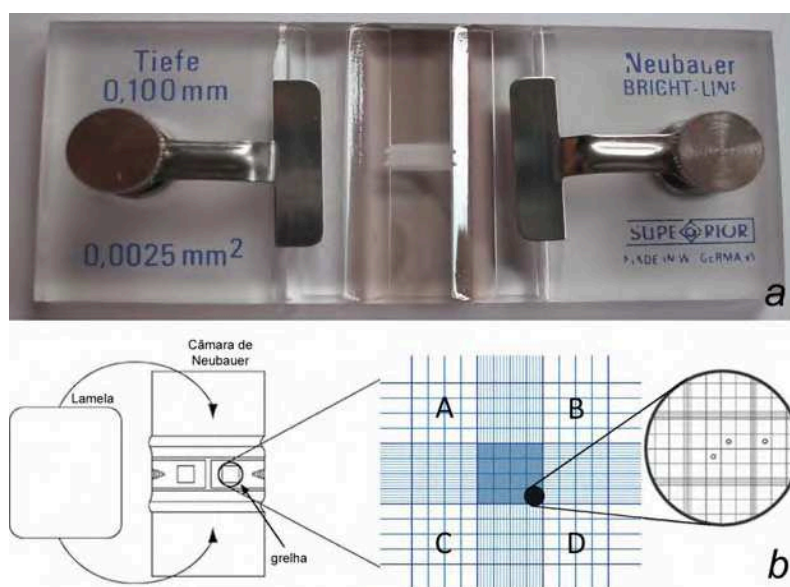


Figura 9 – a) Câmara de Neubauer; b) Visualização pormenorizada da câmara de Neubauer
(Adaptado de Phelan 2007)

2.7.2 Técnica de contagem por placa de Petri

A técnica de contagem por placa de Petri determina as células viáveis, ou seja, as células capazes de formar colônias em meio sólido apropriado. Existem duas técnicas usadas para a determinação de células viáveis: técnica por esfregaço (spread plate) e técnica por incorporação (pour plate). Porém, antes de plaquear é necessário preparar uma série de diluições, com meio de cultura líquido estéril, de maneira a obter várias suspensões de concentrações celulares variadas (Waites 2001; Madigan 2006).

Na técnica por esfregaço (Figura 10), a amostra celular (cerca de 0,1 – 0,2 mL) é espalhada sobre a superfície com meio sólido adequado, contendo agar e nutrientes, usando um instrumento estéril por exemplo uma ança de Drigalsky. De seguida, as pacas são incubadas de forma invertida, a uma temperatura de crescimento ótimo. Desta forma, todas as colônias resultantes devem ficar separadas, de maneira a providenciar uma fácil contagem (Waites 2001; Madigan 2006).

Na técnica por incorporação (Figura 10), a suspensão celular, normalmente 1mL, é colocada numa placa de Petri e misturada com meio de cultura sólido a 48-50°C, de maneira a obter uma mistura solidificada, com a cultura microbiana incubada. Os microrganismos anaeróbicos crescem no agar, enquanto que os microrganismos aeróbicos têm um melhor crescimento perto das superfícies do agar, pois assim têm um melhor suplemento de oxigênio. Porém, a contagem por incorporação pode ser difícil em comparação à contagem por esfregaço; devem ser tomadas precauções em relação à temperatura do meio sólido, pois pode danificar ou matar as células microbianas em crescimento (Waites 2001; Madigan 2006).

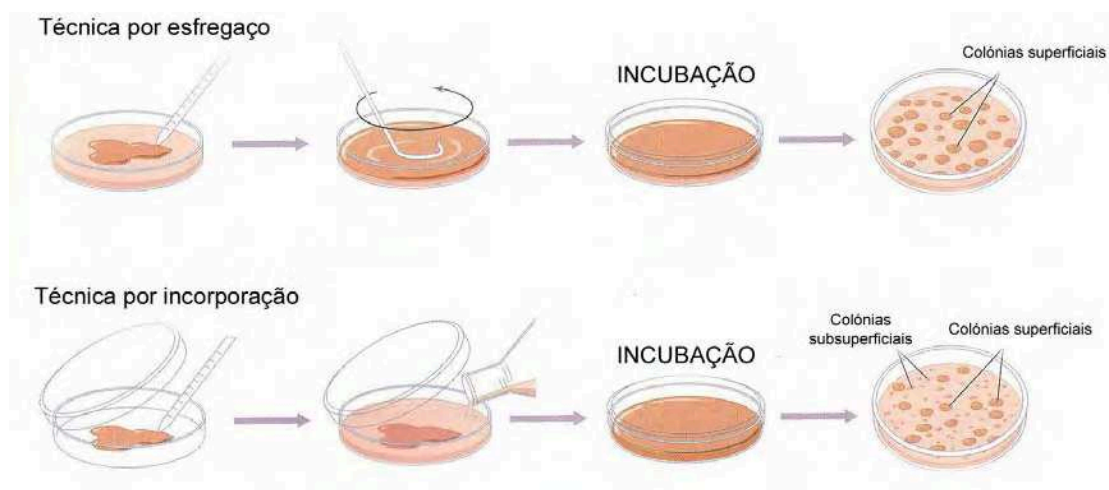


Figura 10 – Ilustração das técnicas por esfregaço e incorporação
(Adaptado de Madigan 2006)

O resultado das contagens de colônias deve estar entre 30 a 300 por placa. É calculada a concentração celular da amostra inicial, partindo da diluição e volume da amostra usada na placa. Assim, a técnica de esfregaço e incorporação mede a unidade formadora de colônias (*colony-forming units* – CFU). Esta medição é equivalente ao número de células viáveis, dependendo da extensão de aglutinação e morfologia do microrganismo. Ambas as técnicas são precisas, necessitando de 24 a 48 horas de incubação para a contagem de células viáveis (Waites 2001; Madigan 2006).

2.7.3 Técnica turbidimétrica

A técnica turbidimétrica providência uma simples, rápida e convencional estimativa da biomassa total que inclui células viáveis e inviáveis. Esta técnica turbidimétrica mede a luz dispersa pela suspensão celular, providenciando a concentração celular. Esta técnica requer a realização de rectas de calibração apropriadas, preparadas a partir de amostras padrão de concentrações celulares conhecidas (Waites 2001; Prescott 2002). Além disso, é preciso ter cuidado ao interpretar os resultados, caso a fermentação contenha partículas ou demasiada cor. O comprimento de onda da radiação deve estar entre 600 e 650 nm e o branco deve ser o meio líquido em que o microrganismos cresceu (Madigan 2006).

2.7.4 Técnica de avaliação de peso seco

A técnica de estimativa de peso seco determina o peso total das células vivas e mortas da amostra microbiana líquida. Envolve a filtração de um volume conhecido da solução homogénea, através de um filtro de membrana previamente pesado, com tamanho de poro de 0,2 μm ou 0,45 μm . Esta filtração é realizada por vácuo e o filtro com a massa microbiana é colocado na estufa a 105°C, até se obter peso constante. Os resultados são expressos em miligramas de células por mililitro de cultura ou em gramas de células por litro de cultura. Porém, esta técnica pode induzir em erro caso a amostra microbiana presente no filtro contenha outros materiais sólidos não celulares. Nestas situações, a amostra microbiana presente no filtro, que contenha outros materiais sólidos não celulares, depois de seca e pesada é colocada na mufla para obtenção de cinzas. O peso das cinzas é subtraído ao valor da amostra microbiana seca, obtendo-se assim o peso seco da biomassa (Waites 2001; Madigan 2006).

2.8 Influência de factores ambientais sobre o crescimento

Os microrganismos devem ser capazes de responder a variações de níveis nutricionais e, particularmente, à limitação de nutrientes. O crescimento de microrganismos é afectado pela natureza química e física que os rodeia. Deste modo, uma compreensão das influências ambientais ajuda no controlo do crescimento microbiano, bem como no estudo da distribuição ecológica dos microrganismos. É verdadeiramente notável a capacidade que alguns microrganismos têm para se adaptarem a ambientes extremos e inóspitos (Prescott 2002).

Existem vários factores ambientais importantes que afectam o crescimento microbiano, tais como a actividade de água, o pH, a temperatura, o nível de oxigénio, a pressão e a radiação (Prescott 2002).

2.8.1 Efeito da temperatura em microrganismos

A temperatura ambiente afecta profundamente os microrganismos, como todos os outros organismos. As temperaturas óptimas de crescimento microbiano

variam amplamente entre 0 a 75°C, considerando que o crescimento de microrganismos estende-se a temperaturas desde -20°C até 100°C. O factor mais determinante deste crescimento é a água, vital à sobrevivência e crescimento dos microrganismos. De facto, os microrganismos são particularmente sensíveis, devido à sua estrutura unicelular e à variação da temperatura do ambiente externo. Um factor importante que influencia o efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano é a sensibilidade das reacções catalisadas por enzimas. Quando aumenta a velocidade de reacção, o metabolismo é mais activo nas temperaturas óptimas para o crescimento microbiano. Porém, quando a temperatura aumenta continuamente, excedendo o limite da temperatura óptima, o crescimento microbiano torna-se lento e a altas temperaturas o microrganismo morre (Prescott 2002; Madigan 2006).

A temperatura elevada provoca danos nos microorganismos por desnaturação das enzimas e outras proteínas. As membranas microbianas também são perturbadas por temperaturas extremas e as camadas lipídicas começam a desintegrar-se. O microrganismo pode ficar danificado de tal modo que o crescimento é inibido, devido ao dano não ser reparado. A temperaturas muito baixas, as membranas solidificam e as enzimas não funcionam rapidamente. Assim, quando os microrganismos estão acima da temperatura óptima, tanto a função como a estrutura celular são afectadas. Se a temperatura está abaixo da temperatura óptima, a função da célula é afectada, mas a composição química e estrutura da célula não é necessariamente afectada (Prescott 2002).

O crescimento microbiano depende da temperatura, que pode ser mínima (temperatura onde o crescimento não ocorre), óptima (temperatura onde o crescimento é mais rápido) e máxima (temperatura onde o crescimento não é possível) (Madigan 2006). Embora a forma da curva da dependência da temperatura possa variar, a temperatura óptima para crescimento encontra-se sempre próxima da temperatura máxima. Mesmo assim, a temperatura óptima, para espécies particulares, não se encontra estabelecida de uma forma rígida, dependendo de outros factores ambientais, como o pH e os nutrientes disponíveis. Deste modo, os microrganismos podem ser classificados segundo a série da temperatura de crescimento: psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos (Figura 11)(Prescott 2002).

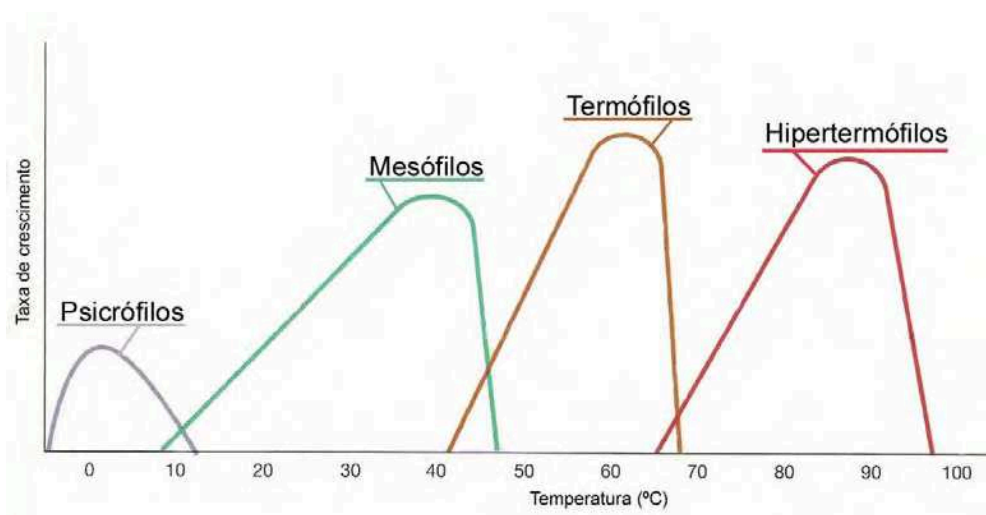


Figura 11 – Classificação de microrganismos segundo a temperatura

(Adaptado de Madigan 2006)

2.8.1.1 Microrganismos Psicrófilos

A superfície da terra é constituída por ambientes de baixas temperaturas, como o caso do Ártico, Antártico, regiões montanhosas e águas marinhas. Nestes ambientes, existem muitos microrganismos adaptados ao frio, onde se verifica o seu crescimento. Neste sistema, os microrganismos psicrófilos são os mais adaptados e têm uma temperatura óptima de crescimento baixa (Nakagawa *et al.* 2003).

Os microrganismos psicrófilos crescem bem à temperatura de 0°C e têm uma temperatura óptima de crescimento a 15°C, sendo a temperatura máxima de cerca de 20°C. Estes microrganismos adaptaram-se ao seu meio ambiente de várias maneiras, onde as suas enzimas e os sistemas de transporte funcionam bem a baixas temperaturas (Prescott 2002).

As membranas celulares de microrganismos psicrófilos têm grandes níveis de ácidos gordos insaturados e permanecem em estado semilíquido a baixas temperaturas. Por vezes, estes microrganismos começam a escoar constituintes celulares a temperaturas superiores a 20°C, por causa da perturbação da membrana celular (Prescott 2002).

2.8.1.2 Microrganismos Mesófilos

Os microrganismos mesófilos têm uma temperatura de crescimento ótimo entre 20 a 45°C, tendo muitas vezes uma temperatura mínima de crescimento de 15 a 20°C e uma temperatura máxima de aproximadamente 45°C. A maioria dos microrganismos, provavelmente, pertence a esta categoria (Prescott 2002). Os microrganismos mesófilos encontram-se em animais de sangue quente, em ambientes terrestres e aquáticos temperados e em latitudes tropicais (Madigan 2006). Quase todos os microrganismos patogênicos dos humanos são mesófilos, como seria de esperar uma vez que o seu crescimento é bastante constante a uma temperatura na ordem dos 37°C (Prescott 2002).

2.8.1.3 Microrganismos Termófilos

Os microrganismos termófilos podem crescer a temperaturas de 55°C ou superiores. A temperatura mínima de crescimento é geralmente 45°C e têm temperatura de crescimento ótima entre 55 e 65°C. A grande maioria são microrganismos procariotas, embora existam algumas algas e fungos. Os microrganismos termófilos diferem dos microrganismos mesófilos por terem uma estabilidade superior ao calor e, por as enzimas e proteínas serem capazes de funcionar a temperaturas elevadas (Prescott 2002). Deste modo, os microrganismos termófilos podem apresentar maior hidrofobicidade no seu núcleo e maior número de interações iônicas (Lieph *et al.* 2006). A membrana lipídica é mais saturada do que as dos microrganismos mesófilos e tem maior ponto de fusão, portanto as membranas permanecem intactas a temperaturas elevadas (até 80°C) (Prescott 2002).

2.8.1.4 Microrganismos Hipertermófilos

Os microrganismos com temperatura ótima de crescimento entre 80 e 113°C são designados por microrganismos hipertermófilos, que usualmente não conseguem crescer abaixo de 55°C (Prescott 2002). Assim, todas as biomoléculas no interior das células, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, estão adaptadas para funcionar adequadamente nestes ambientes. Os microrganismos hipertermófilos encontram-se

em ambientes terrestres e aquáticos de água quente, que são aquecidos pela actividade vulcânica ou geotérmica natural (Atomi 2005).

2.8.2 Efeito da pressão em microrganismos

A maioria dos microrganismos encontra-se distribuída na superfície da água ou da terra, onde a pressão normalmente é de 1 atmosfera (atm) e nunca são significativamente afectados pela pressão (Prescott 2002). Os microrganismos podem ser classificados segundo a pressão de crescimento como: barotolerantes, barofílicos e barofílicos extremos (Figura 12). Os microrganismos barotolerantes têm um melhor crescimento à pressão atmosférica; os microrganismos barofílicos apresentam um crescimento activo a pressões superiores que 1 atm; e os microrganismos barofílicos extremos apresentam um crescimento a pressões elevadas (superiores a 400 atm) (Madigan 2006).

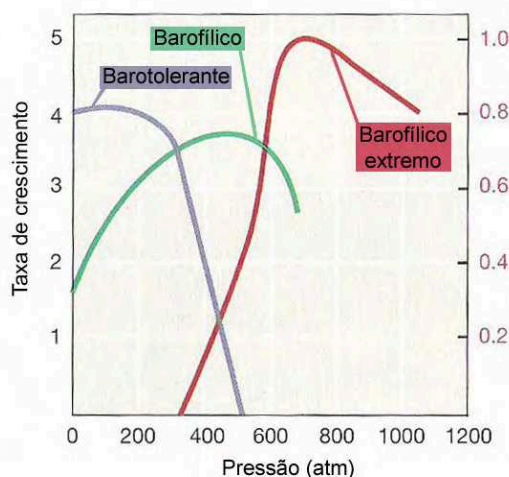


Figura 12 – Classificação de microrganismos segundo a pressão
(Adaptado de Madigan 2006)

Pelo conhecimento da actualidade, as leveduras são afectadas pelo aumento da pressão. A inactivação destes microrganismos devido à alta pressão tem sido intensamente investigada ao longo da última década (Hartmann *et al.* 2004). Ao nível celular, os efeitos da pressão hidrostática estão relacionados com a desnaturação de várias proteínas, a mudanças da fase fosfolipídica e a perda da impermeabilidade da membrana (Perrier-Cornet *et al.* 1999).

A alta pressão hidrostática tem sido bastante usada na indústria alimentar, para evitar a deterioração dos componentes alimentares e nutrientes (Van der Plancken *et al.* 2004). O tratamento de produtos alimentares e substâncias com potencialidades biotecnológicas, com pressão hidrostática, geralmente é conduzido a temperatura ambiente, num processo descontínuo, onde a substância é comprimida até à pressão desejada (Hartmann e Delgado 2004). Este tratamento ocorre a uma pressão constante, mantida durante um determinado tempo, onde a inactivação da célula está relacionada com o tempo em que a pressão é aplicada. Deste modo, ao aplicar uma determinada pressão, não cumprindo o tempo necessário, os efeitos da inactivação do microrganismo são reduzidos (Perrier-Cornet *et al.* 1999).

Existem muitos microrganismos que são mortalmente danificados pela aplicação de pressões elevadas. Os microrganismos sofrem uma ruptura na parede celular e na membrana dos organelos, levando a uma diminuição do volume (Hartmann e Delgado 2004). Deste modo, o tratamento com pressão hidrostática conduz a um decréscimo irreversível no volume da célula do microrganismo, através da transferência de massa, pela membrana da célula. Esta transferência de massa pode reflectir-se numa mudança da permeabilidade da membrana e/ou numa mudança do balanço físico-químico interno da célula. A causa da transferência de massa está relacionada com o volume da célula, constituída essencialmente por água. A diminuição do volume envolve um fluxo de saída de água, consequência da perturbação osmótica e/ou modificação das propriedades mecânicas da estrutura da célula. A mudança de volume pode estar directamente relacionada com o nível de pressão aplicado no meio líquido, sendo difícil avaliar a contribuição da compressão dos constituintes da célula, pois esta é um sistema complexo constituído por membrana plasmática, citosol e vacúolos (Perrier-Cornet *et al.* 1999). No entanto, existem outros microrganismos que são mais sensíveis à pressão, podendo ser inactivados a pressões baixas. Pressões relativamente baixas conduzem a uma inactivação da membrana e do sistema de transporte (Hartmann e Delgado 2004).

Em geral, a pressão hidrostática é transmitida através de um líquido, na maioria dos casos água. Na ausência de água, a pressão hidrostática é ineficaz na inactivação das células, pois os microrganismos secos têm uma grande resistência à alta pressão hidrostática. A água rodeia cada célula e forma uma interface entre a célula e o meio.

Assim, a pressão é transmitida para a célula, através desta camada fina de água, independentemente da natureza do meio de cultura (Espinasse *et al.* 2008).

2.9 Cinética de inactivação microbiana

O uso de temperaturas e/ou pressões elevadas leva à morte de certos microrganismos, onde a taxa específica de morte é superior à taxa específica de crescimento. A variação no tempo do número de microrganismos sobrevivente (N) segue geralmente uma cinética de primeira ordem (Fonseca e Teixeira 2007; Huang *et al.* 2009):

$$\frac{dN}{dt} = -k_d N \quad \text{ou} \quad \frac{d(N/N_0)}{dt} = -k_d (N/N_0) \quad \text{eq 11 e 12}$$

em que k_d é a taxa específica de morte a uma determinada temperatura e N_0 é o número de microrganismos inicial. Ao relacionar a temperatura e a taxa específica de morte, obtém-se a equação de Arrhenius (Fonseca e Teixeira 2007; Huang *et al.* 2009):

$$k_d = A e^{\frac{-E_d}{RT}} \quad \text{eq 13}$$

em que A é um factor pré-exponencial, E_d é a energia de activação de morte térmica, R é a constante universal dos gases (8,31415 J/mol K) e T é a temperatura (K) (Van der Plancken *et al.* 2004; Fonseca e Teixeira 2007). A energia de activação de morte térmica de microrganismos varia entre 167 e 544 kJ/mol (Michael L. Shuler e Kargi 2001).

O intervalo de tempo necessário para reduzir a metade o número inicial de microrganismos é designado por tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Este intervalo de tempo é representado pela eq 14 (Atkins e de Paula 2006):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad \text{eq 14}$$

O tempo de redução decimal, D_{10} , é o tempo necessário para a destruição de 90% do número inicial de microrganismos. Através da integração da eq 11, consegue-se a seguinte relação (Fonseca e Teixeira 2007):

$$D_{10} = \frac{\ln 10}{k_d} \quad \text{eq 15}$$

A determinação de microrganismos por pressão é determinada pelo volume de activação, pela equação Eyring (Van der Plancken *et al.* 2004):

$$k_d = k_0 e \left(- \frac{V_a}{RT} (P - P_0) \right) \quad \text{eq 16}$$

em que k_0 (min^{-1}) é a taxa específica de morte a uma pressão de referência P_0 (MPa), R é a constante universal dos gases ($8,31415 \text{ MPa cm}^3/\text{mol K}$), T é a temperatura (K), P é a pressão (MPa) e V_a é o volume de activação (cm^3/mol) (Van der Plancken *et al.* 2004).

2.10 Controlo do crescimento microbiano

É necessário considerar os microrganismos noutra perspectiva, relacionando-os com o ser humano. Em geral, o controlo de microrganismos pode efectuar-se por descontaminação (limitando o crescimento microbiano), desinfecção (uso de agentes químicos de modo a inibir ou destruir microrganismos) ou esterilização (destruindo todos os microrganismos) (Madigan 2006).

2.10.1 Esterilização por calor

Para todos os microrganismos existe uma temperatura máxima de crescimento, acima da qual os microrganismos morrem. A altas temperaturas todas as moléculas perdem as suas estruturas e funções, pelo processo de desnaturação, sendo a autoclave um dos exemplos mais observados. A autoclave é um dispositivo selado que permite a entrada de vapor de água a baixas pressões (Figura 13). Deste modo, com a temperatura acima do ponto de ebulição, verifica-se o desaparecimento de esporos indesejáveis resistentes ao calor. É de observar que não será a pressão do autoclave que elimina os microrganismos, mas sim a elevada temperatura que é alcançada quando o vapor de água é submetido à pressão (Madigan 2006).



Figura 13 – Sistema de autoclave

2.10.2 Esterilização por radiação

Uma forma eficaz de esterilizar ou reduzir a carga microbiana, de praticamente qualquer substância é, realizada através de radiação electromagnética. As radiações microondas, a radiação ultravioleta (UV), os raios X, as radiações gama (radiações γ) e os electrões são tipos de radiação electromagnética, que podem controlar potencialmente o crescimento microbiano.

A radiação UV, entre 220 e 300 nm de comprimento de onda, tem energia suficiente para causar ruptura no DNA, provocando a eliminação dos microorganismos expostos. A câmara de fluxo laminar, que contém uma fonte de radiação ultravioleta, é um exemplo deste tipo de radiação. Esta luz próxima do visível é usada para a desinfecção de superfícies, ar e outros materiais como a água que não absorvem nesta radiação (Madigan 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Levedura *Pichia stipitis* e condições de manutenção

A levedura *Pichia stipitis* foi fornecida por Cletus Kurtzman, do laboratório NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection, U.S.A), com a referência Y-7124. Cresceu em meio YM (Yeast Medium), a $28\pm1^{\circ}\text{C}$, contendo em g/L: glucose, 10; extrato de malte, 3; extracto de levedura, 3; e agar, 20 (para meios de cultura sólida). A glucose foi preparada separada na realização de meio líquido. Foi mantida a $4\pm1^{\circ}\text{C}$, em meio sólido, e conservada durante o trabalho experimental com repicagens de 4 em 4 meses, para a renovação dos microrganismos.

3.2 Assepsia e Amostragem

3.2.1 Assepsia

A esterilização de todo o material é extremamente necessária, quando são utilizados microrganismos e se trabalha em cultura pura. Todo o material de vidro e/ou plástico e meios de cultura utilizados nas fermentações foram esterilizados num autoclave durante 22 minutos a 120°C .

O manuseamento dos microorganismos realizou-se na câmara de fluxo laminar. As caixas de Petri utilizadas foram colocadas na câmara de fluxo laminar com exposição à radiação ultravioleta, antes da inoculação dos microrganismos.

Os utensílios de metal manuseados foram esterilizados pelo método de aquecimento à chama, tal como é obrigatório a lavagem das mãos com etanol. O uso de máscara é extremamente recomendado e importante.

3.2.2 Amostragem

Nas fermentações em meio líquido, as amostras foram recolhidas na câmara de fluxo laminar com seringas estéreis.

Cada amostra foi colocada em porta amostras estéreis para a realização de crescimento de microrganismos e em porta amostras lavados para a determinação da concentração de biomassa por medição da densidade óptica.

No estudo da estabilidade térmica e bária, a amostra foi transferida do Erlenmeyer para Eppendorfs de capacidade 400 μL , com seringas estéreis. Esta transferência foi realizada na câmara de fluxo laminar.

3.3 Métodos de fermentação

3.3.1 Fermentações em meio sólido

As fermentações em meio sólido efectuaram-se em placas de Petri estéreis. Aqueceu-se o meio sólido, distribuiu-se cerca de 30 mL pelas placas de Petri e esperou-se que o meio solidificasse. As placas foram preparadas com 24 horas de antecedência, para verificar possíveis contaminações do meio YM sólido.

Transferiram-se colónias, de culturas prévias, para placas de Petri preparadas pelo método de riscado, com uma ança devidamente estéril. As culturas cresceram a 28 ± 1 °C, durante 48 a 72 horas.

3.3.2 Fermentação em meio líquido

As fermentações em meio YM líquido efectuaram-se em Erlenmeyers estéreis. Transferiram-se cerca de 17 colónias de levedura, com uma ança devidamente estéril, para um Erlenmeyer com 250mL de meio YM líquido. A capacidade do Erlenmeyer era de 500 mL. O Erlenmeyer foi imediatamente tapado com rolha de gaze e algodão cardado, permanecendo o Erlenmeyer em ambiente limitado de oxigénio. Incubaram-se os Erlenmeyers em incubadora orbital a 28°C e 180 rpm.

3.3.3 Curva de crescimento

A partir da fermentação em meio líquido com 16 h de crescimento, transferiu-se 12,5 mL (5%) para o Erlenmeyer estéril com 250 mL de meio YM líquido e incubou-se a 28 ± 1 °C e 180 rpm. Realizou-se o segundo inóculo em duplicado.

Recolheram-se várias amostra, com seringas estéreis, durante aproximadamente 240 horas, para a determinação da densidade óptica, pelo método turbidimétrico (3.4.2.2), e a contagem de número de microrganismos por placas de

Petri (3.4.1.1). Desta forma, obtiveram-se duas curvas de crescimento em função do tempo.

Ao verificar que o crescimento de microrganismos se encontrava na fase estacionária, determinou-se a concentração da biomassa, pelo método gravimétrico (3.4.2.1).

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Contagem dos microrganismos

3.4.1.1 Contagem dos microrganismos em placas de Petri

Cada amostra foi recolhida, em porta amostras estéreis, na fase estacionária da fermentação líquida. Através da amostra recolhida, realizaram-se várias diluições pretendidas, com meio YM estéril, e homogeneizou-se num agitador vortex de tubos de ensaio. Este procedimento foi realizado com esterilidade na câmara de fluxo laminar. Retirou-se 150µL da diluição pretendida e adicionou-se às placas de Petri estéreis, previamente preparadas. Espalhou-se a diluição com a ajuda de uma ança de Drigalsky. Realizou-se o plaqueamento em duplicado para cada diluição pretendida. Colocaram-se as placas de Petri na incubadora a 28°C, durante 48 horas. Realizou-se a contagem dos microrganismos viáveis da placa de Petri em duplicado. Através desta contagem e das diluições feitas, determinou-se a unidade formadora de colónias por mililitro, ou seja, o número de microrganismos viáveis por mililitro.

3.4.1.2 Contagem dos microrganismos por câmara de Neubauer

A amostra foi recolhida da fase estacionária da fermentação líquida, em porta amostras lavados. Diluiu-se a amostra, com meio YM estéril, e homogeneizou-se num agitador de tubos de ensaio. Transferiu-se 20µL da amostra diluída, colocou-se cuidadosamente na câmara de Neubauer e adicionou-se uma lamela para preencher a câmara. Deixaram-se sedimentar as células durante dois min.

Colocou-se a câmara de Neubauer no microscópio óptico e focou-se a área a contar com a objectiva de menor capacidade. Com a objectiva de 500x, contaram-se as

células dos quatro quadrantes. Efectuaram-se as contagens dos quatro quadrantes em duplicado e através desta contagem e diluições feitas, determinou-se o número total de microrganismos por mililitro.

3.4.2 Determinação da biomassa

3.4.2.1 Método gravimétrico

Retirou-se 10,00 mL da amostra, na fase estacionária, com uma pipeta volumétrica estéril e filtrou-se com um filtro de nitrato de celulose de poro de 0,45 μm , previamente pesados. Secou-se o filtro na estufa a 105°C, durante 72 horas, tempo ao fim do qual o peso já era constante. Realizou-se este procedimento em triplicado. Após este tempo, colocaram-se os filtros num exsiccador, para o arrefecimento até a massa estabilizar e determinou-se o peso seco por subtracção do peso do filtro seco e vazio ao peso do acumulado obtido. A partir deste valor, calculou-se a concentração da biomassa através do volume da amostra filtrada.

3.4.2.2 Método turbidimétrico

Retirou-se cerca de 4 mL da amostra, com uma seringa estéril, para porta amostras lavadas. Mediu-se a densidade óptica a 620 nm, com um espectrofotómetro de duplo feixe Shimadzu UVmini-1240. A medição não deve ultrapassar o valor de 0,600, para não ultrapassar a gama de linearidade da recta de calibração. Caso o valor fosse superior, diluía-se a amostra com meio líquido YM e media-se novamente a densidade óptica. A partir deste valor, correlacionou-se a densidade óptica com a concentração da biomassa para a determinação de rectas de calibração. A medição da densidade óptica foi realizada em duplicado e usou-se meio líquido YM como branco.

3.5 Estudo da estabilidade térmica

Em primeiro lugar, estudaram-se várias temperaturas com um tempo de inactivação fixo, para verificar qual a gama de temperatura a estudar. A amostra foi obtida a partir da fermentação em meio YM líquido na fase estacionária. Transferiu-se, com seringas estéreis, cerca de 400 μL de amostra para Eppendorfs. Os Eppendorfs

tinham capacidade de 400 µL. Colocaram-se os Eppendorfs em banho-Maria durante 15 minutos, onde as temperaturas variaram entre 35 e 55°C. O número inicial de células viáveis (N_0) da análise correspondeu à amostra não submetida a nenhuma temperatura. Após o tempo definido, retiraram-se e colocaram-se os Eppendorfs em gelo. Determinaram-se as unidades formadoras de colónias a partir da contagem dos microrganismos por placas de Petri (3.4.1.1). Desta forma, variou-se a temperatura mantendo-se o tempo constante.

Em segundo lugar, escolheram-se as temperaturas para o estudo da estabilidade térmica. As temperaturas escolhidas para o estudo da estabilidade térmica foram 35,0; 37,5; 40,0; 42,5 e 45,0°C. Nesta fase, variou-se o tempo mantendo a temperatura constante. Foram usados Eppendorfs com mesma capacidade e as amostras foram obtidas da mesma fermentação. Transferiu-se, com seringas estéreis, cerca de 400 µL de inóculo para Eppendorfs. Colocaram-se os Eppendorfs em banho-Maria a uma temperatura constante, onde o tempo variou entre 0 e 85 minutos. Após o tempo definido ao estudo, retiraram-se e colocaram-se os Eppendorfs em gelo. Determinaram-se as unidades formadoras de colónias a partir da contagem dos microrganismos por placas de Petri (3.4.1.1).

Realizou-se todo o estudo da estabilidade térmica com três diluições iniciais de *P. stipitis* (1×10^0 ; 1×10^{-2} e 1×10^{-4}), para verificar se a concentração influenciava a sua inativação.

3.6 Estudo da estabilidade bária

Em primeiro lugar, estudaram-se várias pressões com um tempo de inativação fixo, para verificar qual a gama a estudar. A amostra foi obtida a partir da fermentação em meio YM líquido na fase estacionária. Transferiu-se, com seringas estéreis, cerca de 400 µL de inóculo para Eppendorfs. Os Eppendorfs tinham capacidade de 400 µL. Antes de se submeter a amostra à pressão, colocaram-se os Eppendorfs em banho-Maria a 30°C, durante 5 minutos, de forma a ser realizado à temperatura constante e a obter o número inicial de células viáveis (N_0) da análise. De seguida, submeteram-se os Eppendorfs à pressão durante 15 minutos, onde as pressões variaram entre 50 a 250 MPa. Após o tempo definido, retiraram-se e colocaram-se os Eppendorfs em gelo. Determinaram-se as unidades formadoras de colónias a partir da contagem dos

microrganismos por placas de Petri (3.4.1.1). Desta forma, variou-se a pressão mantendo-se o tempo e a temperatura constantes.

Em segundo lugar, escolheram-se as pressões para o estudo da estabilidade bária. As pressões escolhidas para o estudo da estabilidade bária foram 50, 100, 150 e 200 MPa. Nesta fase, variou-se o tempo mantendo a pressão e temperatura constantes. Foram usados Eppendorfs com mesma capacidade e as amostras foram obtidas da mesma fermentação.

Transferiu-se, com seringas estéreis, cerca de 400 µL de inóculo para Eppendorfs. Antes de se submeter a amostra à pressão, colocaram-se os Eppendorfs em banho-Maria a 30°C, durante 5 minutos, de forma a ser realizado à temperatura constante e a obter número inicial de células viáveis da análise. De seguida, submeteram-se os Eppendorfs a uma pressão constante, variando o tempo entre 0 e 22 minutos. Após o tempo definido ao estudo, retiraram-se e colocaram-se os Eppendorfs em gelo. Determinaram-se as unidades formadoras de colónias a partir da contagem de colónias por placas de Petri (3.4.1.1). Realizou-se todo o estudo da estabilidade bária apenas com uma diluição inicial (1×10^{-2}), dada à limitação de tempo para realizar o estudo.

Em resumo, a Figura 14 esquematiza o desenvolvimento do trabalho realizado:

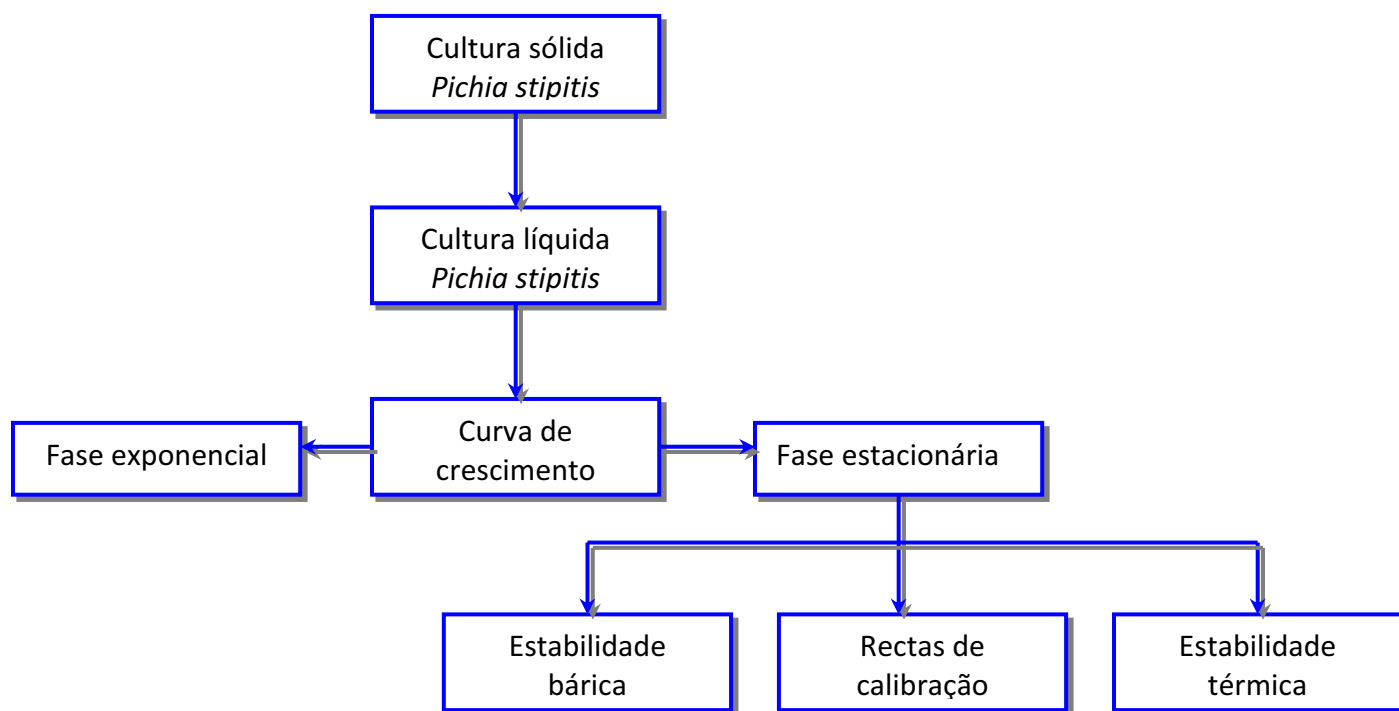


Figura 14 – Esquema ilustrativo do trabalho desenvolvido

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos parâmetros para optimização da quantificação celular

Inicialmente, realizaram-se rectas de calibração e curvas de crescimento e observou-se o efeito da temperatura na levedura. Estas análises foram efectuadas para seleccionar a melhor técnica de monitorização da levedura *P. stipitis*. Desta forma, procurou-se um método simples e rápido para quantificar células viáveis, em vez da técnica por contagem de colónias em placas de Petri.

4.1.1 Rectas de calibração

Realizaram-se rectas de calibração associadas aos parâmetros de densidade óptica, concentração de biomassa, número de microrganismos totais e unidade formadora de colónias para verificar a existência de paralelismo. A densidade óptica foi medida a um comprimento de onda de 620 nm, a concentração de biomassa foi expressa em gramas por litro (g/L), o número de microrganismo totais foi determinado pela quantidade de células (vivas e mortas) por mililitro e a unidade formadora de colónias foi obtida pela quantidade de colónias contadas em placas de Petri por mililitro.

4.1.1.1 Concentração de Biomassa

A recta de calibração final, apresentada na Figura 15, foi realizada a partir de duas rectas de calibração anteriormente determinadas. A concentração de biomassa da primeira recta de calibração foi de $0,9490 \pm 0,1283$ (g/L) e da segunda recta de calibração foi de $3,4760 \pm 0,1233$ (g/L). Nas Tabelas 30 e 31, no Anexo – 7.1.1, encontram-se os respectivos valores de densidade óptica e concentração de biomassa. As concentrações de biomassa das respectivas diluições foram calculadas através do factor de diluição, partindo da concentração de biomassa da amostra não diluída e a concentração de biomassa da amostra não diluída foi obtida por peso seco (3.4.2.1).

Assim, partindo dos valores de densidade óptica e concentração de biomassa, realizou-se a recta de calibração final da densidade óptica em função da concentração de biomassa (Figura 15).

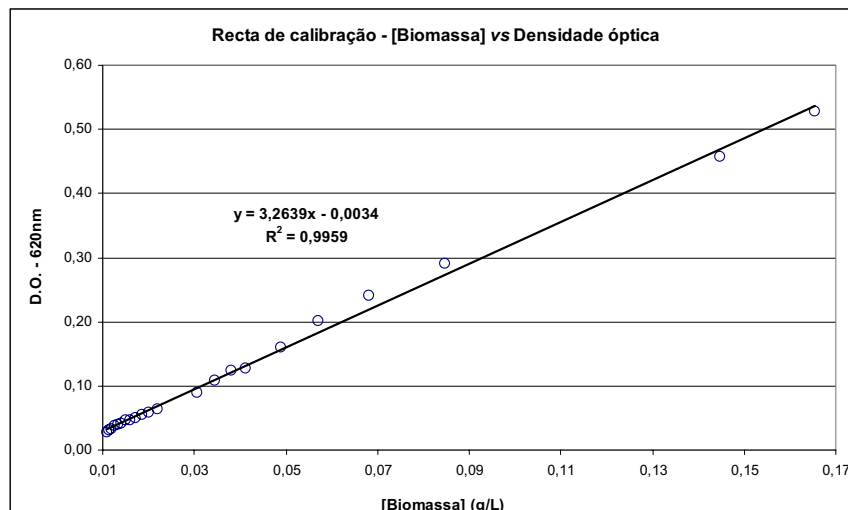


Figura 15 – Recta de calibração final entre a densidade óptica e a concentração da biomassa. A densidade óptica foi medida a um comprimento de onda de 620 nm e a concentração da biomassa foi obtida por peso seco.

A recta de calibração entre a densidade óptica e a concentração da biomassa foi de:

$$\underline{D.O.}_{620nm} = (3,2639 \pm 0,0469)[Biomassa] - (0,0034 \pm 0,0027) \quad \text{eq 17}$$

A eq 17 apresentou um factor de correlação de 0,9959.

4.1.1.2 Unidade formadora de colónias por mililitro

As rectas de calibração associadas à unidade formadora de colónias por mililitro foram determinadas com amostra que continha uma concentração de biomassa de $5,0660 \pm 0,3570$ (g/L) e o número de microrganismo inicial (N_0) de $2,3560 \times 10^8 \pm 3,4667 \times 10^7$ /mL. A amostra apresentava densidade óptica de $15,951 \pm 0,021$ e foi determinada através de diluição da amostra, para não ultrapassar a gama de linearidade.

Na Tabela 1 encontram-se os valores da unidade formadora de colónias, da concentração de biomassa e da densidade óptica. As concentrações de biomassa foram calculadas através do factor de diluição, partindo da amostra não diluída e a concentração de biomassa da amostra não diluída foi obtida por peso seco (3.4.2.1). As densidades ópticas foram calculadas através do factor de diluição, partindo do valor da densidade óptica da amostra não diluída.

Tabela 1 – Resultados das unidades formadoras de colónias, da concentração de biomassa e da densidade óptica

Factor de diluição	CFU/mL	Desvio padrão	[Biomassa] calculada (g/L)	Densidade óptica calculada
200000	$1,2533 \times 10^3$	$1,133 \times 10^2$	$2,5330 \times 10^{-5}$	$7,976 \times 10^{-5}$
300000	$9,5667 \times 10^2$	$1,000 \times 10^1$	$1,6887 \times 10^{-5}$	$5,317 \times 10^{-5}$
500000	$4,7333 \times 10^2$	$6,667 \times 10^1$	$1,0132 \times 10^{-5}$	$3,190 \times 10^{-5}$
750000	$3,4667 \times 10^2$	$4,667 \times 10^1$	$6,7547 \times 10^{-6}$	$2,127 \times 10^{-5}$
1000000	$1,7333 \times 10^2$	$4,667 \times 10^1$	$5,0660 \times 10^{-6}$	$1,595 \times 10^{-5}$
1500000	$1,6000 \times 10^2$	$3,333 \times 10^1$	$3,3773 \times 10^{-6}$	$1,063 \times 10^{-5}$
2000000	$1,3667 \times 10^2$	$1,667 \times 10^1$	$2,5330 \times 10^{-6}$	$7,976 \times 10^{-6}$
2500000	$9,0000 \times 10^1$	$3,333 \times 10^0$	$2,0264 \times 10^{-6}$	$6,380 \times 10^{-6}$
3000000	$6,6667 \times 10^1$	$1,333 \times 10^1$	$1,6887 \times 10^{-6}$	$5,317 \times 10^{-6}$
3500000	$6,0000 \times 10^1$	$6,667 \times 10^0$	$1,4474 \times 10^{-6}$	$4,557 \times 10^{-6}$

Na Figura 16 encontra-se a recta de calibração da concentração da biomassa em função da unidade formadora de colónias por mL e na Figura 17 a recta de calibração da densidade óptica em função da unidade formadora de colónias por mL. Os valores correspondentes a 1.000.000 do factor de diluição não foram usados para a determinação das rectas de calibração, pois encontravam-se fora da gama de linearização.

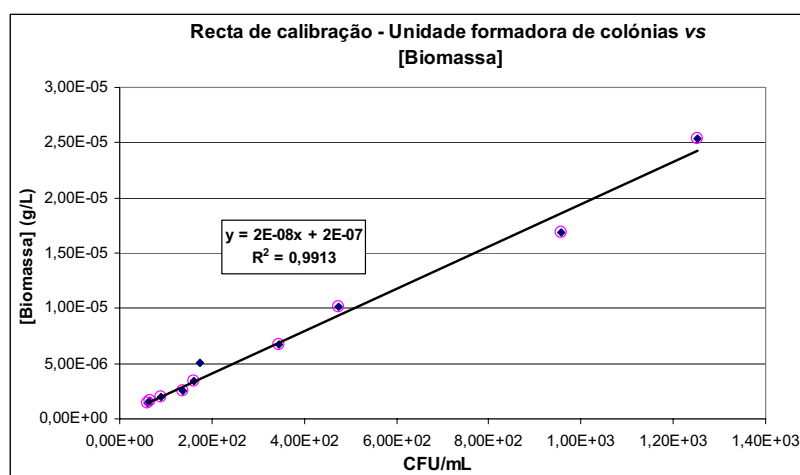


Figura 16 – Recta de calibração entre a concentração da biomassa e unidade formadora de colónias. A concentração da biomassa foi obtida por peso seco e a unidade formadora de colónias foi realizada por contagem em placas de Petri.

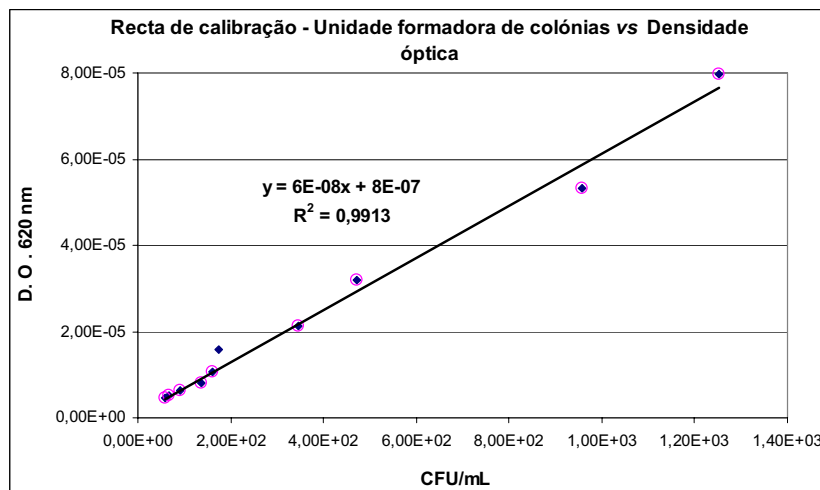


Figura 17 – Recta de calibração entre a densidade óptica e unidade formadora de colónias. A densidade óptica foi medida a um comprimento de onda de 620 nm e a unidade formadora de colónias foi realizada por contagem em placas de Petri.

A recta de calibração entre a concentração de biomassa e a unidade formadora de colónias foi de:

$$[Biomassa] = (1,9175 \times 10^{-8} \pm 6,7620 \times 10^{-10}) (CFU/mL) + (2,4824 \times 10^{-7} \pm 3,8493 \times 10^{-7}) \quad \text{eq 18}$$

A recta de calibração entre a densidade óptica e a unidade formadora de colónias foi de:

$$D.O._{calculada} = (6,0374 \times 10^{-8} \pm 2,1386 \times 10^{-9}) (CFU/mL) + (7,8161 \times 10^{-7} \pm 1,2120 \times 10^{-6}) \quad \text{eq 19}$$

Uma vez que a concentração de biomassa e a densidade óptica foram calculadas a partir das diluições usadas para determinar a unidade formadora de colónias por mililitro, as equações determinadas (eq 18 e 19) apresentaram um factor de correlação de 0,9913.

4.1.1.3 Número de microrganismos totais por mililitro por contagem em câmara de Neubauer

Na determinação das rectas de calibração associadas ao número de microrganismo totais por mililitro, a amostra continha uma concentração de biomassa de $5,0660 \pm 0,3570$ (g/L) e o número de microrganismo inicial de $1,0993 \times 10^{10} \pm 3,4498 \times 10^9$ /mL. A densidade óptica foi de $15,951 \pm 0,021$ e determinada através da diluição da amostra, para não ultrapassar a gama de linearidade.

Na Tabela 2 encontram-se os valores do número de microrganismos totais, da densidade óptica e da concentração de biomassa. As concentrações de biomassa das

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

respectivas diluições foram calculadas através do factor de diluição, partindo da concentração de biomassa da amostra não diluída. A concentração de biomassa da amostra não diluída foi obtida por peso seco (3.4.2.1).

Tabela 2 – Resultados do número de microrganismos totais, da densidade óptica e da concentração de biomassa

Factor de diluição	Nº de microrganismos totais/mL	Desvio padrão	Densidade óptica final ($\lambda = 620 \text{ nm}$)	Desvio padrão	[Biomassa] (g/L)
100	$1,3709 \times 10^8$	$7,247 \times 10^5$	0,230	0,002	$5,0660 \times 10^{-2}$
250	$6,8200 \times 10^7$	$5,798 \times 10^6$	0,177	0,002	$2,0264 \times 10^{-2}$
500	$1,8350 \times 10^7$	$7,778 \times 10^5$	0,135	0,003	$1,0132 \times 10^{-2}$
750	$1,2150 \times 10^7$	$6,364 \times 10^5$	0,128	0,002	$6,7547 \times 10^{-3}$
1000	$5,9250 \times 10^6$	$8,132 \times 10^5$	0,125	0,001	$5,0660 \times 10^{-3}$
5000	$2,9250 \times 10^6$	$2,475 \times 10^5$	0,118	0,001	$1,0132 \times 10^{-3}$
7000	$1,5125 \times 10^6$	$8,839 \times 10^4$	0,116	0,001	$7,2371 \times 10^{-4}$
10000	$9,5000 \times 10^5$	$2,121 \times 10^5$	0,113	0,001	$5,0660 \times 10^{-4}$
20000	$4,6250 \times 10^5$	$5,303 \times 10^4$	0,101	0,001	$2,5330 \times 10^{-4}$

Na Figura 18 encontra-se a recta de calibração da densidade óptica em função do número de microrganismos totais por mL e na Figura 19 a recta de calibração da concentração da biomassa em função do número de microrganismos totais por mL. Em ambas as rectas de calibração, os valores com maior factor de diluição não foram usados, pois encontravam-se fora da gama de linearização.

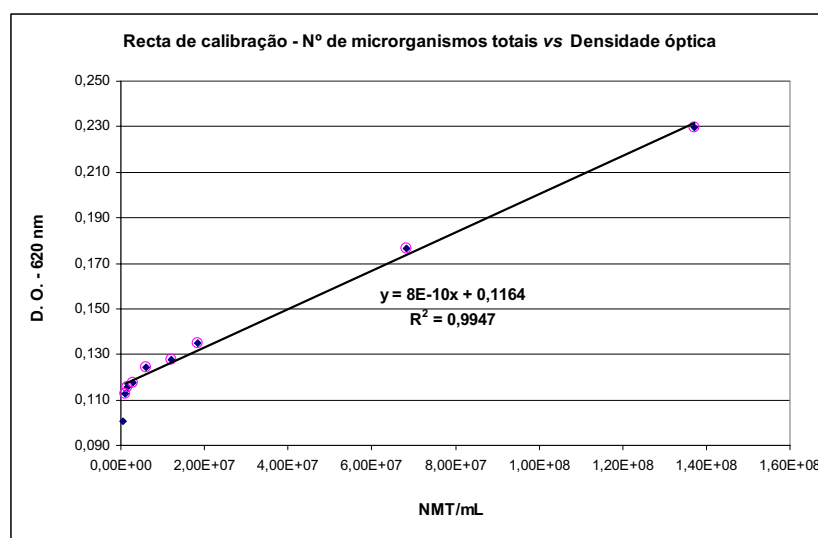


Figura 18 – Recta de calibração entre a densidade óptica e o número de microrganismos totais. A densidade óptica foi medida a um comprimento de onda de 620 nm e o número de microrganismos totais foi medido por contagem em câmara de Neubauer.

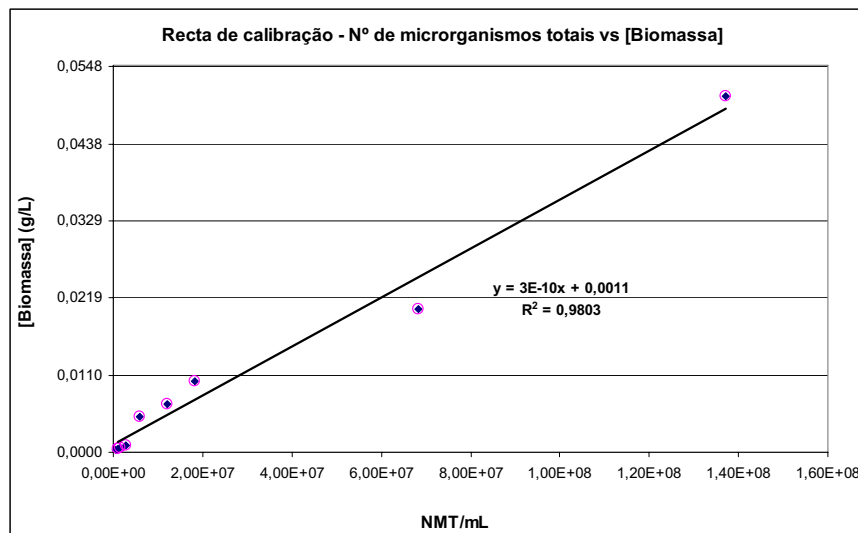


Figura 19 - Recta de calibração entre a concentração da biomassa e o número de microrganismo totais. A concentração da biomassa foi obtida por peso seco e o número de microrganismos totais foi medido por contagem em câmara de Neubauer.

A recta de calibração entre a densidade óptica e o número de microrganismos totais foi de:

$$\underline{D.O.}_{620\text{ nm}} = (8,3967 \times 10^{-10} \pm 2,5031 \times 10^{-11})(NMT) + (0,1164 \pm 0,0014) \quad \text{eq 20}$$

A recta de calibração entre a concentração de biomassa e o número de microrganismos totais foi de:

$$\underline{[Biomassa]} = (3,4824 \times 10^{-10} \pm 2,0160 \times 10^{-11})(NMT) + (0,0011 \pm 0,0011) \quad \text{eq 21}$$

As eq 20 e 21 apresentaram factores de correção de 0,9947 e 0,9803, respectivamente.

4.1.2 Curvas de crescimento

Nas Figura 20, 21, 22 e 23 estão representadas as curvas de crescimento associadas ao logaritmo natural da densidade óptica, da concentração de biomassa, da unidade formadora de colónias e do número de microrganismos totais, respectivamente. Cada curva apresenta a taxa específica de crescimento (μ). Nas Figuras 37, 38, 39 e 40 (Anexo – 7.2) estão representadas as respectivas curvas de crescimento compreendidas entre 0 e 238,5 horas (tempo total de análise).

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

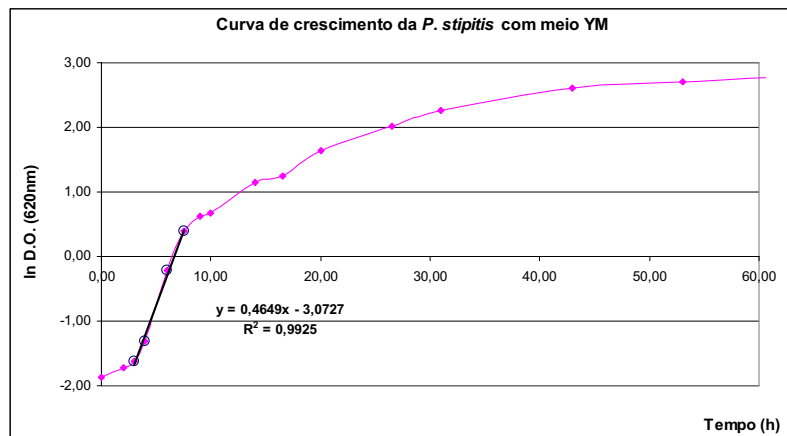


Figura 20 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural da densidade óptica. A densidade óptica foi medida a um comprimento de onda de 620 nm.

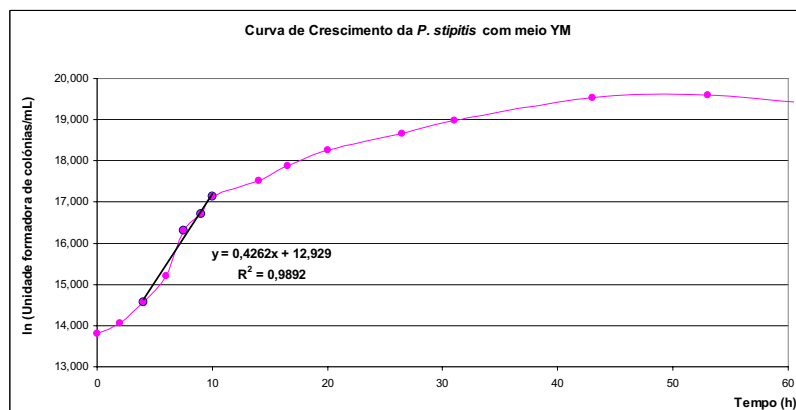


Figura 21 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural da unidade formadora de colônias. A unidade formadora de colônias foi obtida por contagem de microrganismos em placas de Petri.

A amostra usada para determinar as curvas de crescimento, apresentava uma concentração de biomassa de $4,1630 \pm 0,2983$ (g/L). Este valor foi determinado após 240 horas. A **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** (em Anexo – 7.2) apresenta os valores da densidade óptica, da concentração de biomassa, do número de microrganismos totais e da unidade formadora de colônias ao longo do tempo e na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** (Anexo – 7.2) estão calculados os logaritmos naturais dos parâmetros mencionados.

A densidade óptica e a unidade formadora de colônias foram determinadas ao longo da evolução da curva de crescimento, enquanto que a concentração de biomassa e o número de microrganismos totais foram calculados a partir da densidade óptica e por rectas de calibração (eq 17 e 20, respectivamente).

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

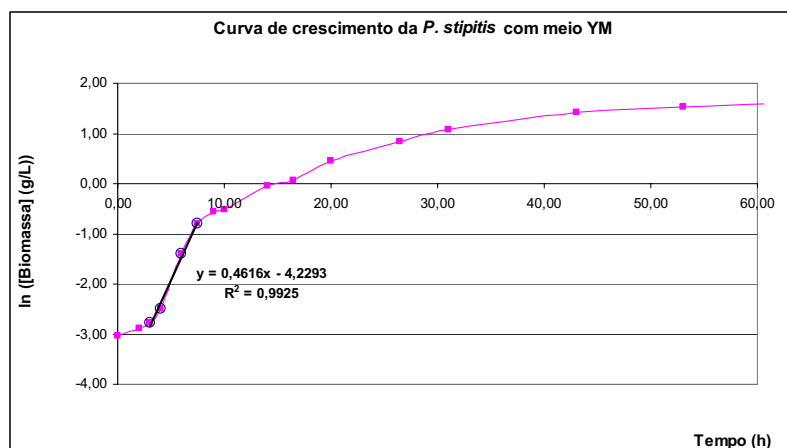


Figura 22 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural da concentração de biomassa. A concentração da biomassa foi obtida através da recta de calibração.

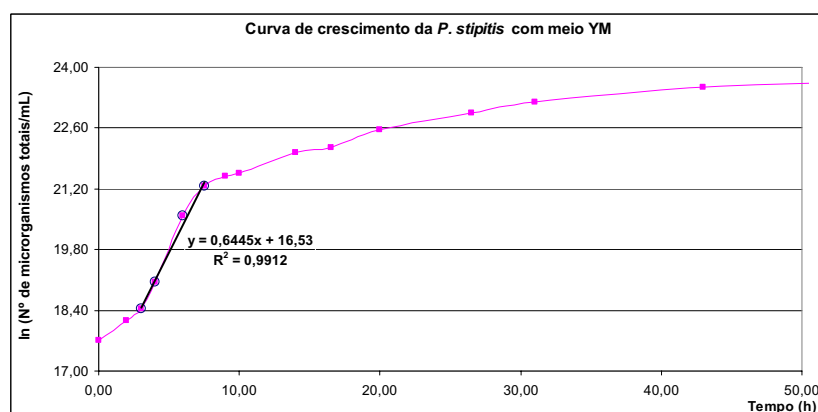


Figura 23 – Curva de crescimento associada ao logaritmo natural do número de microrganismos totais. O número de microrganismos totais foi obtido através da recta de calibração.

Desta forma, obtiveram-se quatro taxas específicas de crescimento. Na Tabela 3 comparam-se os resultados das curvas de crescimento obtidas, os valores da taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação. É de notar que as curvas de crescimento associadas à densidade óptica, concentração de biomassa e unidade formadora de colónias apresentam taxas específicas de crescimento equivalentes, enquanto que a taxa específica de crescimento do número de microrganismos totais apresenta uma taxa específica de crescimento superior.

Tabela 3 – Resultados das curvas de crescimento obtidas

Curva de crescimento → Densidade óptica		
$y = (0,4649 \pm 0,0285)x - (3,0727 \pm 0,1544)$	$r^2 = 0,9925$	
$\mu = 0,4649 \pm 0,0285 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d = 1,49 \text{ h}$	
Curva de crescimento → CFU/mL		
$y = (0,4262 \pm 0,0315)x + (12,9287 \pm 0,2506)$	$r^2 = 0,9892$	
$\mu = 0,4262 \pm 0,0315 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d = 1,63 \text{ h}$	
Curva de crescimento → [Biomassa]		
$y = (0,4616 \pm 0,0284)x - (4,2293 \pm 0,1538)$	$r^2 = 0,9925$	
$\mu = 0,4616 \pm 0,0284 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d = 1,50 \text{ h}$	
Curva de crescimento → Nº de microrganismos totais/mL		
$y = (0,6445 \pm 0,0430)x + (16,5302 \pm 0,2329)$	$r^2 = 0,9912$	
$\mu = 0,6445 \pm 0,0430 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d = 1,08 \text{ h}$	

4.1.3 Comparação dos parâmetros analisados

Na observação das rectas de calibração determinadas (4.1.1), verifica-se um paralelismo entre a densidade óptica, concentração de biomassa, unidade formadora de colónias e o número de microrganismos totais. Apesar de uma técnica promissora, a contagem dos microrganismos totais por câmara de Neubauer verificou-se ser uma técnica limitada, devido à dificuldade de observação e contagem microscópica e, apesar de ter tentado, não se conseguiu fazer a distinção das células vivas e mortas. Seria necessário o uso de programas computadorizados para facilitar a observação microscópica e a contagem de células viáveis.

As curvas de crescimento associadas à densidade óptica, concentração de biomassa e unidade formadora de colónias apresentaram taxas específicas de crescimento equivalentes. Porém, a taxa específica de crescimento do número de microrganismos totais por contagem de câmara de Neubauer é superior. Uma explicação possível para um valor superior da taxa específica de crescimento do número de microrganismos totais deve-se provavelmente a um erro sistemático de contagem que se reflecte na recta de calibração, uma vez que, a correlacção dos resultados é boa, mas a taxa de crescimento calculada é claramente diferente das restantes. É de salientar que esta técnica é exaustiva para quantificar as células

presentes nos vários quadrantes da câmara de Neubauer. Nestas circunstâncias, a contagem de microrganismos por câmara de Neubauer revelou-se uma técnica rápida, mas ineficaz para quantificar microrganismos totais no estudo da estabilidade térmica e bária.

Ao longo da curva de crescimento observou-se o acoplamento entre a unidade formadora de colónias e a densidade óptica (Figura 24).

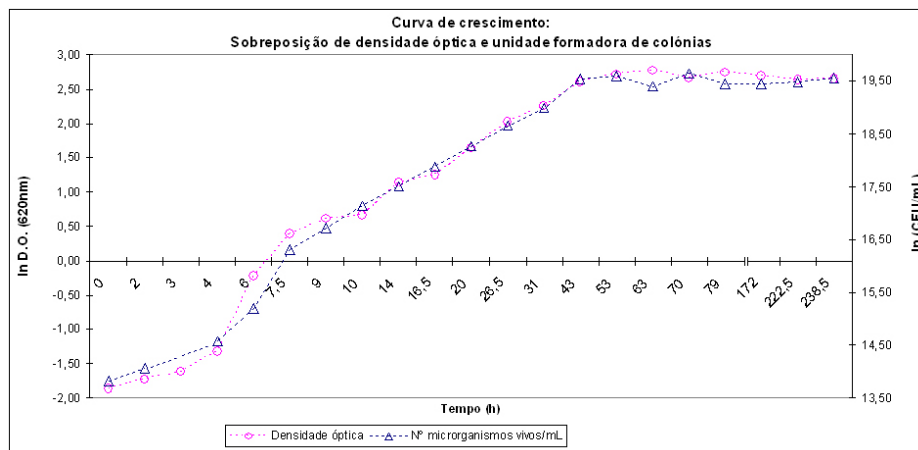


Figura 24 – Curva de crescimento: relação entre a densidade óptica e a unidade formadora de colónias. A densidade óptica foi medida a um comprimento de onda de 620 nm e a unidade formadora de colónias foi obtida por contagem de microrganismos em placas de Petri.

Desta forma, a monitorização do crescimento microbiano poderia ser quantificada através da determinação da densidade óptica e das rectas de calibração. No entanto, para seleccionar esta técnica na quantificação das células viáveis seria necessário realizar uma análise do efeito da temperatura.

Para verificar o efeito da temperatura na levedura, determinaram-se a densidade óptica e unidade formadora de colónias para várias temperaturas (Tabela 4). As densidades ópticas foram calculadas através do factor de diluição, partindo do valor da densidade óptica da amostra não diluída. A unidade formadora de colónias calculada foi determinada a partir da densidade óptica experimental e da recta de calibração (eq 19).

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

Tabela 4 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à temperatura

Temperatura (°C)	Densidade óptica calculada	Desvio padrão	CFU/mL ⁽¹⁾	Desvio padrão	CFU/mL ⁽²⁾ calculada
28	13,674	0,025	$1,8480 \times 10^8$	$2,9401 \times 10^7$	$2,2648 \times 10^8$
35	12,726	0,000	$1,6730 \times 10^8$	$8,9567 \times 10^6$	$2,1079 \times 10^8$
40	12,564	0,102	$1,5130 \times 10^8$	$9,3338 \times 10^5$	$2,0810 \times 10^8$
45	12,672	0,000	$8,4970 \times 10^3$	$6,8401 \times 10^3$	$2,0989 \times 10^8$
50	13,068	0,025	$0,0000 \times 10^0$		$2,1645 \times 10^8$
55	12,726	0,025	$0,0000 \times 10^0$		$2,1079 \times 10^8$

(1) CFU obtida por placa de Petri

(2) CFU determinada pela densidade óptica

Representou-se graficamente a unidade formadora de colónias obtidas e calculadas (Figura 25) e verificou-se que com o aumento da temperatura, a unidade formadora de colónias obtida diminui, enquanto que a densidade óptica manteve-se constante e, consequentemente, a unidade formadora de colónias calculadas também.

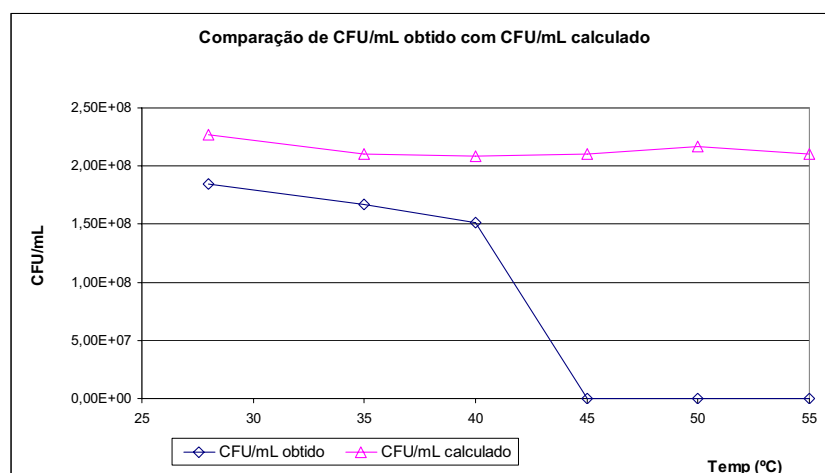


Figura 25 – Gráfico comparativo da unidade formadora de colónias obtido e calculado. A unidade formadora de colónias obtida foi determinada por contagem de microrganismos em placas de Petri e a unidade formadora de colónias calculada foi determinada a partir da densidade óptica experimental e da recta de calibração ($D.O.^{calculada} = (6,0374 \times 10^{-8})(CFU/mL) + (7,8161 \times 10^{-7})$).

Assim, a leitura da densidade óptica para a determinação da unidade formadora de colónias, revelou-se um método ineficaz de quantificar microrganismos viáveis após o tratamento térmico. Esta facto deve-se à difracção de luz das células dos microrganismos inactivados, que leva a uma medição superior relativamente à quantificação por unidade formadora de colónias, em que apenas as células viáveis são

contabilizadas. Com este estudo tentou-se encontrar uma técnica de contagem de células viáveis mais rápida e menos dispendiosa para prosseguir com o trabalho.

Porém, conclui-se que a quantificação dos microrganismos viáveis no estudo da estabilidade térmica e bária só poderia ser realizada através da técnica de contagem dos microrganismos em placa de Petri.

4.2 Estabilidade térmica

4.2.1 Efeito da temperatura na inactivação da levedura

P. stipitis

A amostra para o estudo da estabilidade térmica apresentava uma concentração de biomassa de $4,1910 \pm 0,1706$ (g/L) e um número de microrganismos iniciais (N_0) de $1,8480 \times 10^8 \pm 2,9401 \times 10^7$ CFU/mL. Na Tabela 4 encontram-se os valores da unidade de formadora de colónias obtidas de acordo com a temperatura usada.

De acordo com a Figura 25 e os valores das unidades formadoras de colónias obtidas, escolheu-se uma gama de temperatura entre 35,0 e 45,0 °C para o estudo da estabilidade térmica. Não foram escolhidas temperaturas inferiores a 35,0 °C, pois a inactivação da levedura era muito lenta, e superiores a 45,0 °C, devido à rápida inactivação da levedura.

4.2.2 Estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^0

A amostra para o estudo da estabilidade térmica na diluição de 1×10^0 apresentava uma concentração de biomassa de $4,1910 \pm 0,1706$ (g/L) e um número de microrganismos iniciais de $1,7330 \times 10^8 \pm 2,3544 \times 10^7$ CFU/mL. Foi realizado a inactivação da levedura *P. stipitis* ao longo do tempo, mantendo a temperatura constante. As temperaturas seleccionadas foram 35,0; 37,5; 40,0; 42,5 e 45,0 °C. Nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 estão apresentados os valores da unidade formadora de colónias obtidas ao longo do tempo, nas temperaturas de 35,0; 37,5; 40,0; 42,5 e 45,0 °C,

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

respectivamente. A partir da eq 12, calcularam-se os parâmetros de N/N_0 e logaritmo natural de N/N_0 , apresentados nas tabelas em anexo (7.3).

Tabela 5 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 35,0 °C na diluição de 1×10^0

35,0 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$
2,5	$1,3600 \times 10^8$	$5,6569 \times 10^6$
7,5	$1,4200 \times 10^8$	$1,9779 \times 10^7$
15,0	$1,3400 \times 10^8$	$1,9806 \times 10^7$
20,0	$1,3100 \times 10^8$	$1,4142 \times 10^6$
30,0	$1,2733 \times 10^8$	$1,8856 \times 10^6$
55,0	$1,3167 \times 10^8$	$8,0139 \times 10^6$
85,0	$1,3000 \times 10^8$	$4,7140 \times 10^6$

Tabela 6 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 37,5 °C na diluição de 1×10^0

37,5 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$
2,5	$2,4300 \times 10^8$	$7,0711 \times 10^6$
7,5	$2,0900 \times 10^8$	$2,9698 \times 10^7$
15,0	$1,6767 \times 10^8$	$4,7140 \times 10^5$
20,0	$1,5600 \times 10^8$	$8,4853 \times 10^6$
32,0	$1,3278 \times 10^8$	$7,3853 \times 10^6$
55,0	$1,0867 \times 10^8$	$8,4853 \times 10^6$
85,0	$9,5333 \times 10^7$	$8,4859 \times 10^6$

Tabela 7 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^0

40,0 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$
2,5	$1,6000 \times 10^8$	$5,6569 \times 10^6$
7,5	$1,1000 \times 10^8$	$1,1314 \times 10^7$
15,0	$7,4000 \times 10^7$	$2,8284 \times 10^6$
30,0	$2,5000 \times 10^7$	$2,3570 \times 10^6$
55,0	$5,0222 \times 10^6$	$6,7387 \times 10^6$
85,0	$1,2833 \times 10^5$	$7,0711 \times 10^3$

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

Tabela 8 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^0

42,5 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$
2,5	$1,8267 \times 10^8$	$9,4281 \times 10^5$
7,5	$6,9333 \times 10^7$	$2,8284 \times 10^6$
10,0	$4,9067 \times 10^7$	$1,6028 \times 10^6$
15,0	$1,0711 \times 10^7$	$6,2225 \times 10^6$
32,0	$1,5800 \times 10^5$	$9,4281 \times 10^2$
55,0	$6,7333 \times 10^3$	$1,4142 \times 10^2$
85,0	$6,6667 \times 10^1$	$9,4281 \times 10^0$

Tabela 9 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^0

45,0 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$
2,5	$8,3667 \times 10^7$	$1,4142 \times 10^6$
5,0	$3,5333 \times 10^7$	$8,4853 \times 10^6$
7,5	$5,9333 \times 10^6$	$1,8856 \times 10^5$
15,0	$1,3900 \times 10^4$	$1,8903 \times 10^4$
32,0	$4,6667 \times 10^1$	$1,8876 \times 10^1$
41,0	$0,0000 \times 10^0$	

Através dos valores obtidos, esquematizou-se o gráfico da Figura 26, usando o parâmetro de N/N_0 ao longo do tempo, nas diferentes temperaturas.

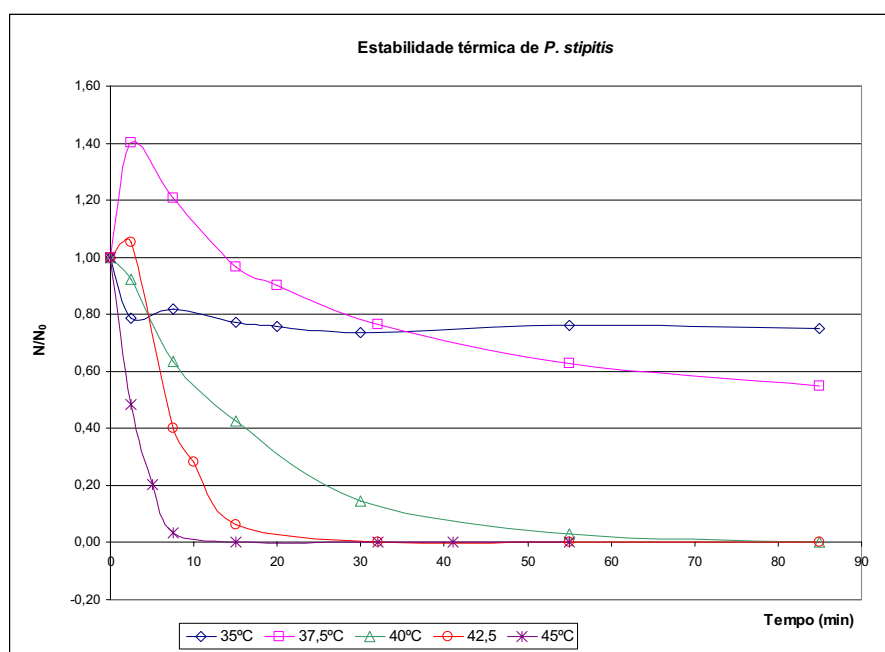


Figura 26 – Gráfico da estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^0

Os valores do parâmetro de N/N_0 superiores a 1,00 não foram usados para a determinação da taxa específica de morte (k_d), pois verificou-se um aumento do número de células viáveis. Estes resultados poderão ser devidos a activação de crescimento celular. Pela observação gráfica da Figura 26, verificou-se que a curva de inactivação da levedura segue uma tendência exponencial ao longo do tempo. Não foi calculada a taxa específica de morte à temperatura de 35 °C, devido à inexistência de inactivação da levedura.

Assim, na Figura 27 encontram-se as taxas específicas de morte da levedura *P. stipitis* nas temperaturas de 37,5; 40,0; 42,5 e 45,0 °C, para a diluição da amostra inicial de 1×10^0 .

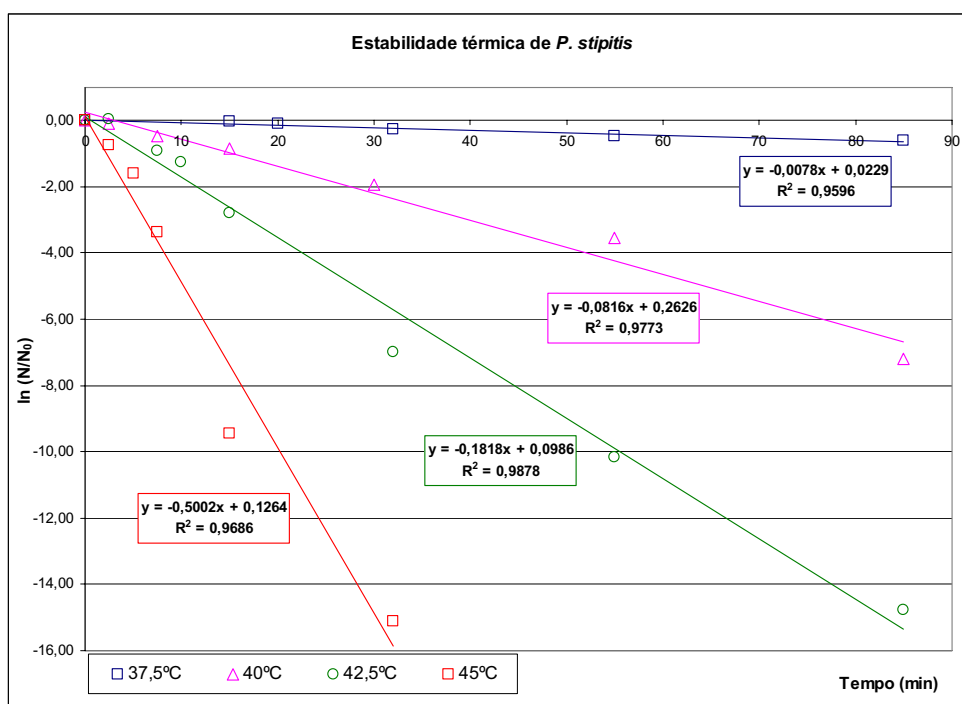


Figura 27 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^0

4.2.3 Estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

A amostra para o estudo da estabilidade térmica na diluição de 1×10^{-2} apresentava uma concentração de biomassa de $4,1910 \pm 0,1706$ (g/L). As temperaturas seleccionadas foram 40,0; 42,5 e 45,0 °C. Para a temperatura de 40,0 °C, o número de

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

microrganismo inicial era de $3,7333 \times 10^6 \pm 5,6569 \times 10^5$ CFU/mL e para as temperaturas de 42,5 e 45,0 °C, número de microrganismo inicial era de $2,2300 \times 10^6 \pm 5,2326 \times 10^5$ CFU/mL. Nas Tabelas 10, 11 e 12 estão apresentados os valores da unidade formadora de colônias obtidos ao longo do tempo, nas temperaturas de 40,0; 42,5 e 45,0 °C, respectivamente. Foram calculados os parâmetros de N/N_0 e logaritmo natural de N/N_0 , apresentados nas tabelas em anexo (0).

Tabela 10 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-2}

40,0 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$3,7333 \times 10^6$	$5,6569 \times 10^5$
2,5	$3,1467 \times 10^6$	$1,0920 \times 10^6$
7,5	$2,6489 \times 10^6$	$1,2845 \times 10^6$
15,0	$2,2133 \times 10^6$	$1,1314 \times 10^5$
30,0	$1,5933 \times 10^5$	$1,6028 \times 10^4$
55,0	$4,4533 \times 10^4$	$2,6399 \times 10^3$
85,0	$0,0000 \times 10^0$	

Tabela 11 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-2}

42,5 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$2,2300 \times 10^6$	$5,2326 \times 10^5$
2,5	$1,7233 \times 10^6$	$2,0270 \times 10^5$
5,0	$1,5700 \times 10^6$	$4,2426 \times 10^4$
7,5	$1,0633 \times 10^6$	$9,8995 \times 10^4$
15,0	$4,1667 \times 10^5$	$1,1785 \times 10^5$
30,0	$2,8333 \times 10^4$	$4,7140 \times 10^2$
55,0	$1,7667 \times 10^2$	$1,4142 \times 10^1$
85,0	$0,0000 \times 10^0$	

Tabela 12 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-2}

45,0 °C		
tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$2,2300 \times 10^6$	$5,2326 \times 10^5$
2,5	$1,2000 \times 10^6$	$1,8856 \times 10^5$
5,0	$2,2000 \times 10^5$	$3,7712 \times 10^4$
7,5	$1,9333 \times 10^4$	$9,4281 \times 10^2$
10,0	$4,4667 \times 10^3$	$2,8284 \times 10^2$
15,0	$2,8000 \times 10^2$	$2,8284 \times 10^1$
20,0	$5,3333 \times 10^1$	$1,8856 \times 10^1$
30,0	$0,0000 \times 10^0$	

Através dos valores obtidos, esquematizou-se o gráfico da Figura 28, usando o parâmetro de N/N_0 ao longo do tempo, nas diferentes temperaturas.

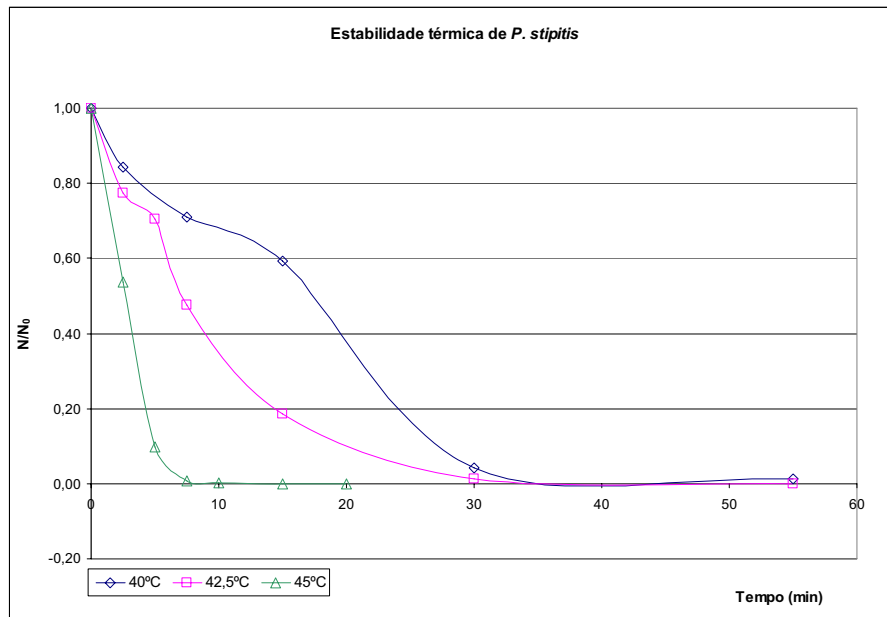


Figura 28 – Gráfico da estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

A inativação da levedura ao longo do tempo segue uma tendência exponencial. Assim, na Figura 29 encontram-se as taxas específicas de morte da levedura *P. stipitis* nas temperatura de 40,0; 42,5 e 45,0 °C, para a diluição da amostra inicial de 1×10^{-2} .

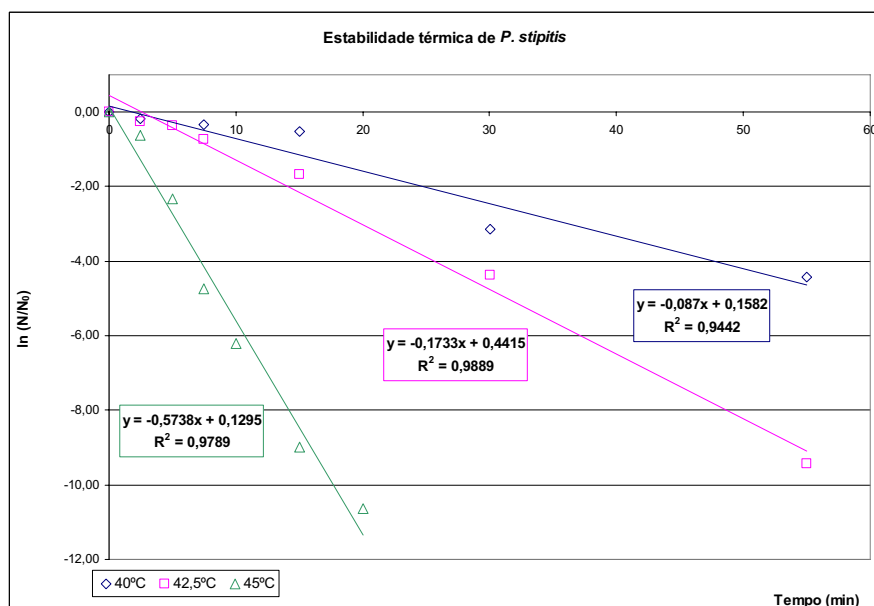


Figura 29 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^{-2}

4.2.4 Estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-4}

A amostra para o estudo da estabilidade térmica na diluição de 1×10^{-4} apresentava uma concentração de biomassa de $4,1910 \pm 0,1706$ (g/L) e um número de microrganismos iniciais de $2,0367 \times 10^4 \pm 2,3099 \times 10^3$ CFU/mL. As temperaturas seleccionadas foram 40,0; 42,5 e 45,0 °C. Nas Tabelas 13, 14 e 15 apresentam-se os valores da unidade formadora de colónias ao longo do tempo, nas temperaturas de 40,0; 42,5 e 45,0 °C, respectivamente. Os parâmetros de N/N_0 e logaritmo natural de N/N_0 foram calculados de acordo com a eq 12, apresentados nas tabelas em anexo (0).

Tabela 13 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-4}

40,0 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0	$2,0367 \times 10^4$	$2,3099 \times 10^3$
2,5	$1,5567 \times 10^4$	$3,1584 \times 10^3$
7,5	$1,3267 \times 10^4$	$8,4853 \times 10^2$
15	$1,0800 \times 10^4$	$1,1314 \times 10^3$
30	$2,8000 \times 10^3$	$2,8284 \times 10^3$
55	$2,0333 \times 10^2$	$9,8995 \times 10^1$
85	$4,0000 \times 10^1$	$9,4281 \times 10^0$

Tabela 14 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-4}

42,5 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$2,0367 \times 10^4$	$2,3099 \times 10^3$
2,5	$1,5367 \times 10^4$	$9,8995 \times 10^2$
7,5	$7,3000 \times 10^3$	$9,8999 \times 10^2$
15,0	$2,8000 \times 10^3$	$1,8856 \times 10^2$
30,0	$1,2000 \times 10^2$	$1,1314 \times 10^2$
55,0	$0,0000 \times 10^0$	

Tabela 15 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-4}

45,0 °C		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$2,0367 \times 10^4$	$2,3099 \times 10^3$
2,5	$9,4000 \times 10^3$	$1,9799 \times 10^3$
5,0	$1,5289 \times 10^3$	$5,3422 \times 10^2$
7,5	$3,2000 \times 10^2$	$7,5425 \times 10^2$
10,0	$2,6667 \times 10^1$	$2,8284 \times 10^1$
15,0	$0,0000 \times 10^0$	

Através dos valores obtidos, esquematizou-se o gráfico da Figura 30, usando o parâmetro de N/N_0 ao longo do tempo, nas diferentes temperaturas.

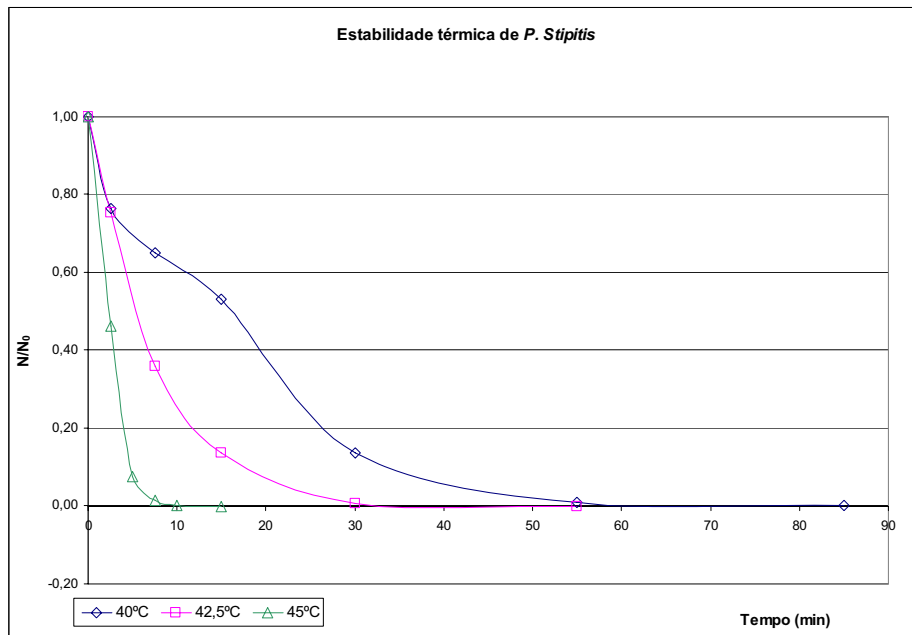


Figura 30 – Gráfico da estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-4}

Pela observação da Figura 30, a inativação da levedura ao longo do tempo segue uma tendência exponencial. Assim, na Figura 31 encontram-se as taxas específicas de morte da levedura *P. stipitis* nas temperaturas de 40,0; 42,5 e 45,0 °C, para a diluição da amostra inicial de 1×10^{-4} .

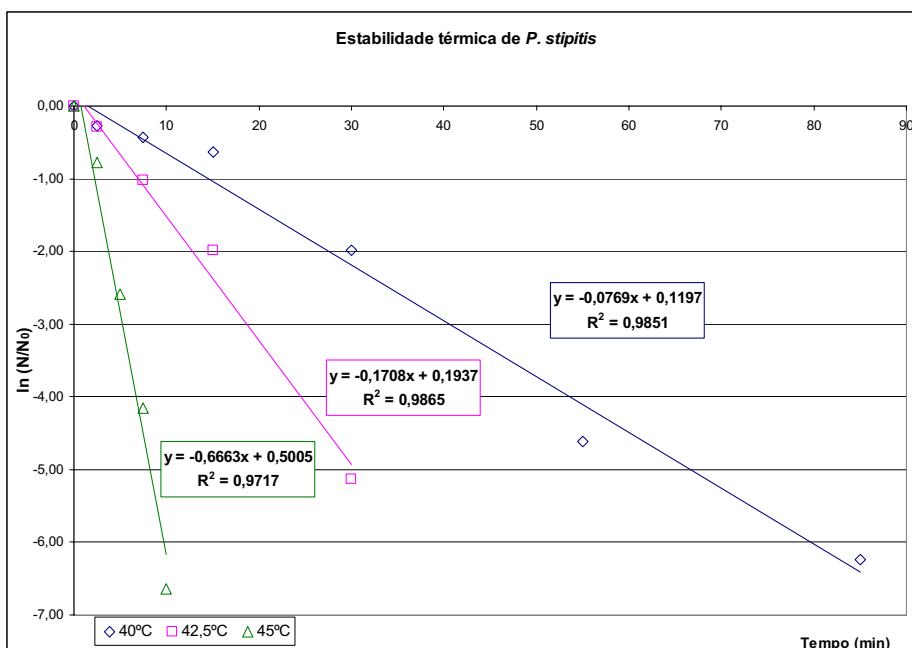


Figura 31 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^{-4}

4.2.5 Resumo da estabilidade térmica de *P. stipitis*

Através da análise gráfica das Figuras 27, 29 e 31, observou-se que a inactivação térmica segue uma cinética de primeira ordem, como mencionado anteriormente. Desta forma, foram calculadas as das taxas específicas de morte térmica e determinou-se o tempo de meia-vida e o tempo de redução decimal, por intermédio das eq 14 e 15, respectivamente. Na Tabela 16 encontra-se o resumo dos resultados obtidos para a estabilidade térmica de *P. stipitis*.

Tabela 16 – Resumo dos resultados da estabilidade térmica de *P. stipitis*

Diluição	T (°C)	k_d (min ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (min)	D_{10} (min)
1×10^0	37,5	$0,0078 \pm 0,0008$	0,9960	88,67	295,20
	40,0	$0,0816 \pm 0,0056$	0,9773	8,49	28,22
	42,5	$0,1818 \pm 0,0083$	0,9878	3,81	12,66
	45,0	$0,5002 \pm 0,0450$	0,9686	1,39	4,60
1×10^{-2}	40,0	$0,0870 \pm 0,0106$	0,9442	7,97	26,47
	42,5	$0,1733 \pm 0,0082$	0,9889	4,00	13,29
	45,0	$0,5738 \pm 0,0377$	0,9789	1,21	4,01
1×10^{-4}	40,0	$0,0769 \pm 0,0042$	0,9851	9,01	29,94
	42,5	$0,1708 \pm 0,0115$	0,9865	4,06	13,48
	45,0	$0,6663 \pm 0,0656$	0,9717	1,04	3,46

Observou-se que a taxa específica de morte térmica é idêntica nas diferentes diluições, à mesma temperatura, ou seja, a variação da diluição na amostra inicial não afecta significativamente a taxa específica de morte térmica. Assim, com o aumento da temperatura, a taxa específica de morte térmica aumenta, diminuindo o tempo de meia-vida e o tempo de redução decimal.

A inactivação térmica de leveduras tem sido atribuída a danos na membrana plasmática e degradação de componentes intracelulares (Shynkaryk *et al.* 2009). Estas análises são realizadas através do microscópio electrónico (SEM – *Scanning electron microscope*) para verificar possíveis danos na membrana plasmática e degradação de componentes intracelulares. No entanto, não foram realizadas análise deste tipo, relativamente à inactivação térmica, devido à limitação de tempo.

4.2.6 Energia de activação de morte térmica

A energia de activação de morte térmica foi calculada a partir da equação de Arrhenius (eq 13). Desta forma e logaritmando a eq 13, obtém-se o parâmetro $1/(RT)$ no eixo das abcissas e o parâmetro $\ln k_d$ no eixo das ordenadas. O simétrico do declive determinado corresponde à energia de activação de morte (E_d). Na Tabela 17 encontram-se calculados os parâmetros mencionados, as temperaturas de inactivação e as taxas específicas de morte térmica nas diferentes diluições iniciais. Para o cálculo da energia de activação de morte térmica, as temperaturas foram convertidas para o sistema internacional (Kelvin) e a constante universal dos gases foi de 8,31415 J/mol K. Como os valores de k_d não eram influenciados pela diluição inicial da levedura, optou-se por fazer apenas uma determinação da energia de activação de morte térmica, com todos os valores da taxa específica de morte térmica (k_d).

Tabela 17 – Determinação de parâmetros associados à energia de activação de morte térmica

1×10^0			
T (K)	$1/(RT)$	k_d (min ⁻¹)	$\ln k_d$
310,65	$3,8719 \times 10^{-4}$	0,0078	-4,8536
313,15	$3,8409 \times 10^{-4}$	0,0816	-2,5059
315,65	$3,8105 \times 10^{-4}$	0,1818	-1,7048
318,15	$3,7806 \times 10^{-4}$	0,5002	-0,6927
1×10^{-2}			
T (K)	$1/(RT)$	k_d (min ⁻¹)	$\ln k_d$
313,15	$3,8409 \times 10^{-4}$	0,0870	-2,4418
315,65	$3,8105 \times 10^{-4}$	0,1733	-1,7527
318,15	$3,7806 \times 10^{-4}$	0,5738	-0,5555
1×10^{-4}			
T (K)	$1/(RT)$	k_d (min ⁻¹)	$\ln k_d$
313,15	$3,8409 \times 10^{-4}$	0,0769	-2,5652
315,65	$3,8105 \times 10^{-4}$	0,1708	-1,7673
318,15	$3,7806 \times 10^{-4}$	0,6663	-0,4060

$T = ^\circ\text{C} + 273,15$ (K)

Na Figura 32 representou-se graficamente o valor da energia de activação de morte.

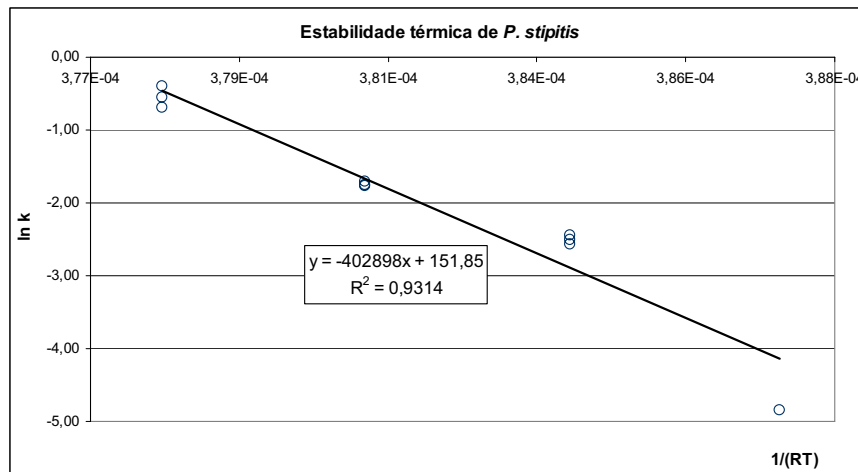


Figura 32 – Gráfico da energia de activação de morte térmica

A equação obtida foi de:

$$\ln k = - (402898,58 \pm 38666,02)(1/(RT)) - (151,87 \pm 14,59) \quad \text{eq 22}$$

O valor da energia de activação de morte da levedura *P. stipitis* obtido foi de $402898,58 \pm 38666,02$ J/mol, com um coeficiente de correlação de 0,9314. Segundo Michael L. Shuler e Kargi 2001, a energia de activação de morte térmica de microrganismos varia entre 167 e 544 kJ/mol. O valor da energia de activação de morte da levedura *P. stipitis* obtido encontra-se nesta gama.

4.3 Estabilidade b́arica

4.3.1 Efeito da press̃o na inactivão da levedura *P. stipitis*

A amostra para o estudo da estabilidade b́arica apresentava uma concentrão de biomassa de $4,1910 \pm 0,1706$ (g/L). Foi realizada a inactivão da levedura *P. stipitis* a v́arias press̃es. Nas Tabelas 18, 19 e 20 apresentam-se os valores de unidade formadora de colónias para cada press̃o. Foram analisadas as diluĩes de 1×10^0 , 1×10^{-2} e 1×10^{-4} , com um ńumero de microrganismos iniciais de $4,1700 \times 10^8 \pm 6,6468 \times 10^7$ CFU/mL, $1,5033 \times 10^6 \pm 4,2426 \times 10^4$ CFU/mL e $2,5267 \times 10^4 \pm 7,6368 \times 10^3$ CFU/mL, respectivamente. Como anteriormente mencionado, verificou-se que a

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

concentração inicial não influenciava os parâmetros de inativação térmica. No entanto, realizaram-se as análises a várias diluições (1×10^0 ; 1×10^{-2} e 1×10^{-4}), pois com pressão poderia ocorrer algum efeito na diluição da levedura, mesmo se inativada.

Tabela 18 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^0

1×10^0		
Pressão (MPa)	CFU/mL	Desvio padrão
0	$4,1700 \times 10^8$	$6,6468 \times 10^7$
50	$2,5400 \times 10^8$	$1,8856 \times 10^6$
100	$1,8267 \times 10^8$	$9,4281 \times 10^6$
150	$1,6467 \times 10^6$	$4,0541 \times 10^5$
200	$2,9333 \times 10^3$	$4,7140 \times 10^1$
250	$8,3333 \times 10^1$	$2,3570 \times 10^1$

Tabela 19 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-2}

1×10^{-2}		
Pressão (MPa)	CFU/mL	Desvio padrão
0	$1,5033 \times 10^6$	$4,2426 \times 10^4$
50	$2,0700 \times 10^6$	$1,9328 \times 10^5$
100	$2,7233 \times 10^6$	$2,9698 \times 10^5$
150	$4,5667 \times 10^4$	$8,0139 \times 10^3$
200	$6,6667 \times 10^1$	$1,8856 \times 10^1$
250	$0,0000 \times 10^0$	

Tabela 20 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-4}

1×10^{-4}		
Pressão (MPa)	CFU/mL	Desvio padrão
0	$2,5267 \times 10^4$	$7,6368 \times 10^3$
50	$2,3500 \times 10^4$	$8,2496 \times 10^3$
100	$2,0967 \times 10^4$	$5,2326 \times 10^3$
150	$1,5000 \times 10^3$	$7,0711 \times 10^1$
200	$0,0000 \times 10^0$	
250	$0,0000 \times 10^0$	

Na Figura 33 encontram-se os valores de unidade formadora de colónias de para cada pressão e a evolução da inativação da levedura *P. stipitis*. Os parâmetros de N/N_0 e logaritmo natural de N/N_0 foram calculados de acordo com a eq 12, apresentados nas tabelas em anexo (7.6).

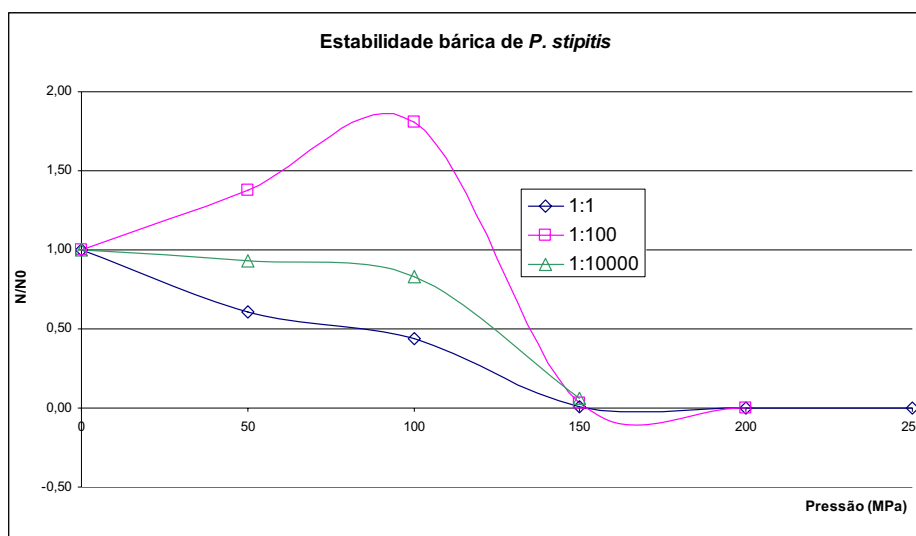


Figura 33 – Gráfico da estabilidade bária de *P. stipitis* nas diluições de 1×10^0 , 1×10^{-2} e 1×10^{-4}

De acordo com a Figura 33, escolheu-se uma gama de pressão entre 50,0 e 200,0 MPa para o estudo da estabilidade bária. Inicialmente, verificou-se que na diluição de 1×10^{-2} ocorreu um aumento do número de células a 50,0 e 100,0 MPa. Este resultado pode ser devido à separação de agregados celulares ou eventual activação de crescimento celular. Assim, para tentar ter obter mais conhecimento deste fenómeno, escolheu-se a diluição de 1×10^{-2} para os estudos seguintes.

4.3.2 Estabilidade bária de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

A amostra para o estudo da estabilidade bária na diluição de 1×10^{-2} apresentava uma concentração de biomassa de $4,860 \pm 0,1706$ (g/L). Nas Tabelas 22, 23, 24, 25, 26 e 27 apresentam-se os valores de unidade formadora de colónias ao longo do tempo, nas pressões de 50,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 e 200,0 MPa, respectivamente.

O número de microrganismos iniciais para o estudo da estabilidade bária na diluição de 1×10^{-2} encontram-se na Tabela 21.

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

Tabela 21 – Número de microrganismos iniciais para o estudo da estabilidade bária das várias pressões

50,0 MPa	
<i>Tempo (min)</i>	<i>N₀(CFU/mL)</i>
0,0; 2,5; 5,5; 10,0	$7,3667 \times 10^5 \pm 5,1854 \times 10^4$
100,0 MPa	
<i>Tempo (min)</i>	<i>N₀(CFU/mL)</i>
0,0; 5,0; 10,0	$1,6033 \times 10^6 \pm 2,7813 \times 10^5$
2,5; 15,0	$7,3667 \times 10^5 \pm 5,1854 \times 10^4$
125,0 MPa	
<i>Tempo (min)</i>	<i>N₀(CFU/mL)</i>
0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0	$3,8667 \times 10^5 \pm 7,5425 \times 10^4$
150,0 MPa	
<i>Tempo (min)</i>	<i>N₀(CFU/mL)</i>
0,0; 5,0; 10,0	$1,6033 \times 10^6 \pm 2,7813 \times 10^5$
16,0; 22,0	$7,3667 \times 10^5 \pm 5,1854 \times 10^4$
175,0 MPa	
<i>Tempo (min)</i>	<i>N₀(CFU/mL)</i>
0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0	$3,8667 \times 10^5 \pm 7,5425 \times 10^4$
200,0 MPa	
<i>Tempo (min)</i>	<i>N₀(CFU/mL)</i>
0,0; 5,0; 10,0	$1,6033 \times 10^6 \pm 2,7813 \times 10^5$
1,5; 3,0	$7,3667 \times 10^5 \pm 5,1854 \times 10^4$

Ocorreu esta variação do número de microrganismos iniciais na pressão, porque foi necessário realizar o ensaio em três momentos diferentes, para obter mais pontos experimentais.

Tabela 22 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 50MPa na diluição de 1×10^{-2}

50 Mpa		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$7,3667 \times 10^5$	$5,1854 \times 10^4$
2,5	$6,4667 \times 10^5$	$1,2257 \times 10^5$
5,5	$8,2667 \times 10^5$	$3,7712 \times 10^4$
10,0	$8,7333 \times 10^5$	$9,4281 \times 10^3$

—RESULTADOS E DISCUSSÃO—

Tabela 23 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 100MPa na diluição de 1×10^{-2}

100 Mpa		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,6033 \times 10^6$	$2,7813 \times 10^5$
2,5	$8,2667 \times 10^5$	$3,7712 \times 10^4$
5,0	$2,1500 \times 10^6$	$2,1213 \times 10^5$
10,0	$2,2867 \times 10^6$	$1,6028 \times 10^5$
15,0	$1,1167 \times 10^6$	$2,3570 \times 10^4$

Tabela 24 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 125MPa na diluição de 1×10^{-2}

125 Mpa		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$3,8667 \times 10^5$	$7,5425 \times 10^4$
2,5	$1,8333 \times 10^5$	$7,0711 \times 10^4$
5,0	$1,2000 \times 10^5$	$1,4142 \times 10^4$
10,0	$4,8000 \times 10^4$	$1,8856 \times 10^3$
15,0	$3,3333 \times 10^4$	$5,1854 \times 10^3$

Tabela 25 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 150MPa na diluição de 1×10^{-2}

150 Mpa		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,6033 \times 10^6$	$2,7813 \times 10^5$
5,0	$3,0044 \times 10^5$	$9,3953 \times 10^4$
10,0	$3,9800 \times 10^4$	$4,0541 \times 10^3$
16,0	$1,7267 \times 10^4$	$1,0371 \times 10^3$
22,0	$2,3100 \times 10^3$	$1,5415 \times 10^3$

Tabela 26 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 175MPa na diluição de 1×10^{-2}

175 Mpa		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$3,8667 \times 10^5$	$7,5425 \times 10^4$
2,5	$3,1000 \times 10^4$	$3,2998 \times 10^3$
5,0	$2,5500 \times 10^3$	$1,7206 \times 10^3$
10,0	$1,0333 \times 10^2$	$5,1854 \times 10^1$
15,0	$1,2530 \times 10^1$	$7,1924 \times 10^0$

Tabela 27 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 200MPa na diluição de 1×10^{-2}

200 Mpa		
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	$1,6033 \times 10^6$	$2,7813 \times 10^5$
1,5	$5,8133 \times 10^4$	$3,3941 \times 10^3$
3,0	$1,4000 \times 10^2$	$1,7913 \times 10^2$
5,0	$5,3333 \times 10^1$	$2,8284 \times 10^0$
10,0	$2,0000 \times 10^1$	$9,4281 \times 10^0$

Através dos valores obtidos, obteve-se o gráfico da Figura 34, de N/N_0 ao longo do tempo, nas diferentes pressões. Os parâmetros de N/N_0 e logaritmo natural de N/N_0 foram calculados de acordo com a eq 12, apresentados nas tabelas em anexo (7.7).

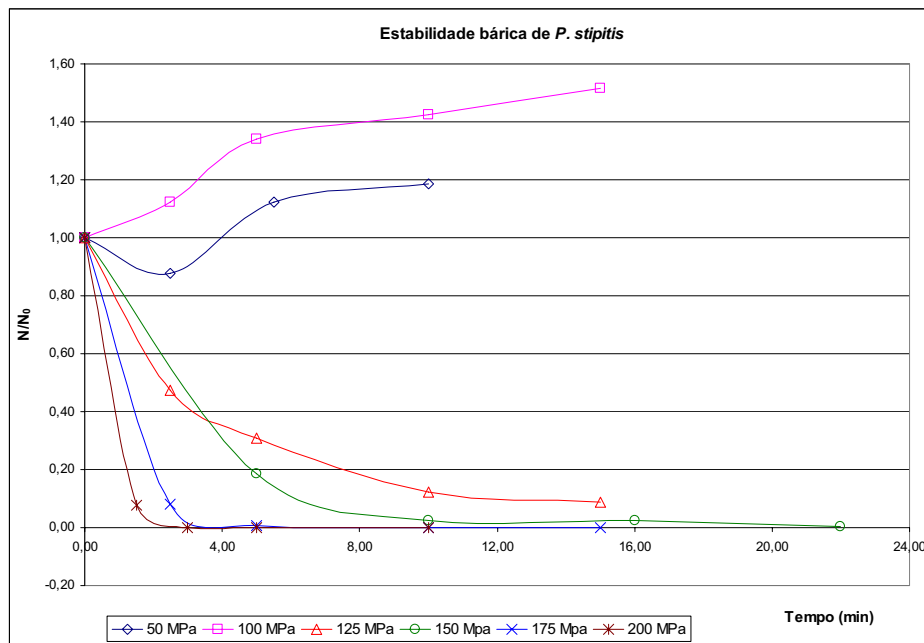


Figura 34 – Gráfico da estabilidade bária de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

Pela observação da Figura 34, a inativação bária da levedura ao longo do tempo segue uma tendência exponencial. Como mencionado anteriormente, nas pressões de 50,0 e 100,0 MPa, confirmou-se crescimento ao longo do tempo. Estes resultados são interessantes e importantes em estudos futuros, para verificar se o crescimento microbiano é devido à desagregação de agregados celulares ou activação celular. Assim, a 50,0 ou 100,0 MPa não foi possível determinar a taxa específica de morte.

Na Figura 35 encontram-se as taxas específicas de morte da levedura *P. stipitis* nas pressões de 125,0 a 200,0 MPa, para a diluição da amostra inicial de 1×10^{-2} .

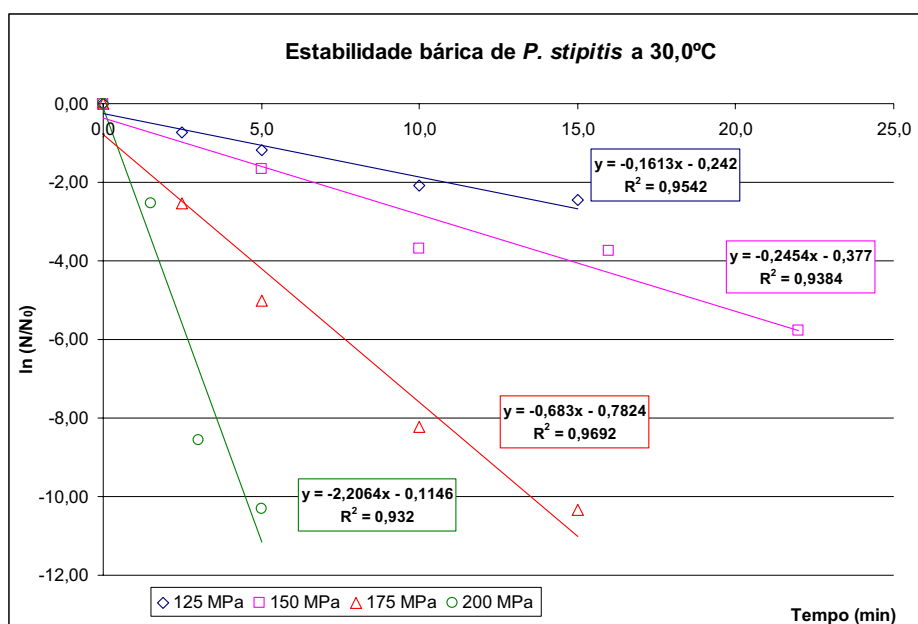


Figura 35 – Gráfico das taxas específicas de morte na diluição de 1×10^{-2}

4.3.3 Resumo da estabilidade bária de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

Através das taxas específicas de morte calculadas, determinou-se o tempo de meia-vida e o tempo de redução decimal. Na Tabela 28 encontra-se o resumo dos resultados obtidos da estabilidade bária de *P. stipitis*.

Tabela 28 – Resumo dos resultados da estabilidade bária de *P. stipitis*

Diluição	P (MPa)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	D_{10} (min)
1×10^{-2}	125,0	$-0,1613 \pm 0,1724$	4,30	14,28
	150,0	$-0,2454 \pm 0,0363$	2,82	9,38
	175,0	$-0,6830 \pm 0,0703$	1,01	3,38
	200,0	$-2,2064 \pm 0,4213$	0,31	1,04

Observou-se que com o aumento da pressão, a taxa específica de morte aumenta, diminuindo o tempo de meia-vida e o tempo de redução decimal. Um factor determinante que explica a inactivação de leveduras por pressão é a ruptura da membrana plasmática, levando a uma diminuição do volume da célula (Hartmann *et al.* 2004; Espinasse *et al.* 2008). A análise à ruptura da membrana plasmática é realizada através de microscopia electrónica (SEM – *Scanning electron microscope*). No entanto, esta análise não foi possível devido à limitação de tempo.

4.3.4 Volume de activação

O volume de activação foi obtido a partir da equação de Eyring (eq 16). Desta forma e logaritmando a eq 16, obtém-se o parâmetro $-(P/RT)$ no eixo das abcissas e o parâmetro $\ln k_d$ no eixo das ordenadas. Na Tabela 29 estão calculados os parâmetro mencionados, as pressões de inactivação e as taxas específicas de morte. Para o cálculo do volume de activação, a temperatura foi convertida para o sistema internacional (Kelvin) e a constante universal dos gases foi de $8,31415 \text{ MPa cm}^3/\text{mol K}$.

Tabela 29 – Determinação de parâmetros associados ao volume de activação

$k_d (\text{min}^{-1})$	$\ln k$	$P (\text{MPa})$	$-(P/RT)$
0,1613	-1,8245	125,0	$-4,960 \times 10^{-2}$
0,2454	-1,4049	150,0	$-5,951 \times 10^{-2}$
0,6830	-0,3813	175,0	$-6,943 \times 10^{-2}$
2,2064	0,7914	200,0	$-7,935 \times 10^{-2}$

$T = ^\circ\text{C} + 273,15 (\text{K})$

Através dos valor da Tabela 29, determinou-se o volume de activação (V_a). Na Figura 36 representou-se graficamente o valor do volume de activação.

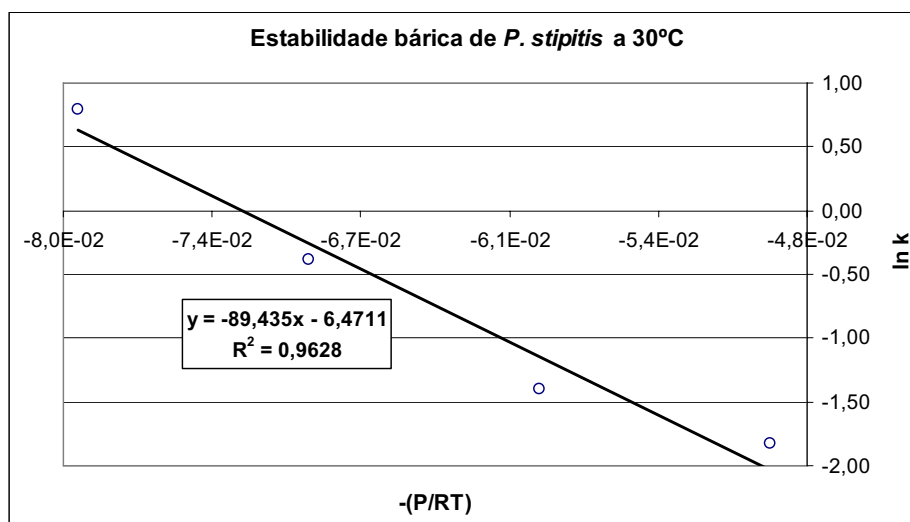


Figura 36 – Gráfico do volume de activação

A equação obtida foi de:

$$\ln k = - (89,435 \pm 12,434) (P/(RT)) - (6,471 \pm 0,813) \quad \text{eq 23}$$

O valor do volume de activação da levedura *P. stipitis* foi de $-89,435 \pm 12,434$ cm³/mol, com um coeficiente de correlação de 0,9628. Na literatura ainda não foi definida uma gama para o volume de activação de leveduras. No entanto, segundo Palou *et al.* 1997, o volume de activação da levedura *Zygosaccharomyces bailii* apresentou um valor de $-65,22 \pm 0,87$ cm³/mol. O valor do volume de activação da levedura *P. stipitis* obtido é da mesma ordem de grandeza que da levedura *Z. bailii*.

5. CONCLUSÃO E PROPOSTAS FUTURAS

Inicialmente, tencionava-se desenvolver uma técnica rápida de contagem celular de *P. stipitis*, para facilitar a realização das inativações térmicas e bárias. A técnica mais promissora seria através de contagem directa por microscopia óptica, usando a câmara de Neubauer. No entanto, esta técnica determinava os microrganismos vivos e mortos da amostra, sendo necessário usar uma técnica de coloração para determinar apenas os microrganismos vivos, no caso das inativações térmicas e bárias. Entretanto, observou-se que a taxa específica de crescimento de microrganismos totais era superior em relação às outras taxas específicas de crescimento obtidas. Deste modo, procurou-se outra técnica rápida de contagem celular. Como alternativa, procurou-se outro método de leitura rápida para a determinação da quantidade microbiana. Realizaram-se testes associados à densidade óptica e unidade formadora de colónias, ou seja, determinou-se a densidade óptica da amostra e calculou-se a unidade formadora de colónias através de rectas de calibração. Porém, também este método não era vantajoso, pois à medida que a levedura se tornava inactiva, o valor da densidade óptica mantinha-se constante. Assim, optou-se a técnica de contagem por placas de Petri para quantificar as células de *P. stipitis* no estudo de inactivação térmica e bária.

A análise à levedura *P. stipitis* apresentou taxa específica de crescimento de $0,4262 \pm 0,0315 \text{ h}^{-1}$ e um tempo de duplicação de 1,63h (1h38min), ou seja, o número de colónias formadas em função do tempo é de 0,4262 e o tempo necessário para a formação de uma célula nova a partir da célula mãe é de 1h38min.

A inactivação térmica e bária da levedura ao longo do tempo segue uma tendência exponencial, ou seja, foi possível a determinação das taxas específicas de morte associadas às temperaturas e pressões, procedendo à determinação da energia de activação de morte e volume de activação. A energia de activação de morte foi de $402898,58 \pm 38666,02 \text{ J/mol}$ e volume de activação de $-89,435 \pm 12,434 \text{ cm}^3/\text{mol}$.

A inactivação térmica e/ou bária tem efeitos secundários na levedura, ou seja, a levedura fica inactiva por ruptura da membrana plasmática ou pela desnaturação de componentes celulares e proteínas. A ruptura da membrana plasmática pode ser analisada por microscopia electrónica e a desnaturação de proteínas por métodos espectrométricos. Estas análises não foram realizadas devido à limitação de tempo.

—CONCLUSÃO E PROPOSTAS FUTURAS—

Verificou-se um crescimento microbiano após o tratamento térmico e bórico para a temperatura 37,5°C, nos tempos 2,5 e 7,5 minutos (diluição de 1×10^0), e nas pressões de 50 e 100 MPa (diluição de 1×10^{-2}). Seria interessante realizar estudos futuros para verificar qual a razão para estes resultados.

Conclui-se então que com o aumento da temperatura e/ou pressão, a taxa específica de morte aumenta, o tempo de meia-vida e o tempo de redução decimal diminuem e o número de células inactivadas aumenta. A técnica mais apropriada de contagem, para quantificar o número células de *P. stipitis*, foi a partir da contagem de colónias por placas de Petri. Ainda existem alguns estudos a realizar para verificar o comportamento da levedura *P. stipitis* a pressões mais baixas.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agbogbo, F. K. e G. Coward-Kelly (2008). "*Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia stipitis*". Biotechnology Letters **30**(9): 1515-1524.
- Agbogbo, F. K., G. Coward-Kelly, M. Torry-Smith e K. S. Wenger (2006). "*Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis*". Process Biochemistry **41**(11): 2333-2336.
- Agbogbo, F. K., F. D. Haagsen, D. Milam e K. S. Wenger (2008). "*Fermentation of acid-pretreated corn stover to ethanol without detoxification using Pichia stipitis*". Applied Biochemistry and Biotechnology **145**(1-3): 53-58.
- Aristidou, A. e M. Penttilä (2000). "*Metabolic engineering applications to renewable resource utilization*". Current Opinion in Biotechnology **11**(2): 187-198.
- Atkins, P. W. e J. de Paula (2006). "*Atkins' physical chemistry*". Oxford ;, Oxford University Press.
- Atomi, H. (2005). "*Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes*". Current Opinion in Chemical Biology **9**(2): 166-173.
- Chundawat, S. P. S., B. Venkatesh e B. E. Dale (2007). "*Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility*". Biotechnology and Bioengineering **96**(2): 219-231.
- Espinasse, V., J. M. Perrier-Cornet, A. Marecat e P. Gervais (2008). "*High-pressure inactivation of dried microorganisms*". Biotechnology and Bioengineering **99**(1): 180-188.
- Fonseca, M. M. d. e J. A. Teixeira (2007). "*Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*". Lidel - Edições técnica, Lda.
- Hartmann, C. e A. Delgado (2004). "*Numerical simulation of the mechanics of a yeast cell under high hydrostatic pressure*". Journal of Biomechanics **37**(7): 977-987.
- Hartmann, C., K. Mathmann e A. Delgado (2004). "*Mechanical stresses in cellular structures under high hydrostatic pressure*". 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Rio de Janeiro, BRAZIL, Elsevier Sci Ltd.
- Huang, H., M. S.-L. Brooks, H.-J. Huang e X. D. Chen (2009). "*Inactivation Kinetics of Yeast Cells during Infrared Drying*". Drying Technology: An International Journal **27**(10): 1060 - 1068.

- Kamm, B., P. R. Gruber e M. Kamm (2006). "*Biorefineries - industrial processes and products : status quo and future directions*". Weinheim; [Great Britain], Wiley-VCH.
- Kamm, B. e M. Kamm (2004). "*Biorefinery - Systems*". Chemical and Biochemical Engineering Quarterly **18**(1): 1-6.
- Kurtzman, C. P., Fell, J.W. (1996). "*The yeast. A taxonomic study*". Elsevier Science.
- Lieph, R., F. A. Veloso e D. S. Holmes (2006). "*Thermophiles like hot T*". Trends in Microbiology **14**(10): 423-426.
- Liu, Z. L., P. J. Slininger e S. W. Gorsich (2005). "*Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains*". Applied Biochemistry and Biotechnology **121**: 451-460.
- Madigan, M., Martinko, J. (2006). "*Brock Biology of Microorganisms*". United States of America, International Edition.
- Michael L. Shuler e F. Kargi (2001). "*Bioprocess Engineering: Basic Concepts*". Prentice Hall.
- Nakagawa, T., Y. Fujimoto, M. Uchino, T. Miyaji, K. Takano e N. Tomizuka (2003). "*Isolation and characterization of psychrophiles producing cold-active beta-galactosidase*". Letters in Applied Microbiology **37**(2): 154-157.
- Nian-Qing, S., D. Brian, S. Fred, C. Jose e W. J. Thomas (1999). "*Disruption of the cytochrome c gene in xylose-utilizing yeast Pichia stipitis leads to higher ethanol production*". Yeast **15**(11): 1021-1030.
- Palmqvist, E. e B. Hahn-Hägerdal (2000). "*Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*". Bioresource Technology **74**(1): 25-33.
- Perrier-Cornet, J. M., M. Hayert e P. Gervais (1999). "*Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization*". Journal of Applied Microbiology **87**(1): 1-7.
- Prescott, M. L., Klein, D. A., Harley, J. P. (2002). "*Microbiology*". McGraw Hill.
- Shynkaryk, M. V., N. I. Lebovka, J. L. Lanoiselle, M. Nonus, C. Bedel-Clotour e E. Vorobiev (2009). "*Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (Saccharomyces cerevisiae)*". Journal of Food Engineering **92**(2): 189-195.

- U.S., C. (2000). "*Biomass Research and Development, Act of 2000*". Washington D.C.
- Van der Plancken, I., M. Delattre, Indrawati, A. Van Loey e M. E. G. Hendrickx (2004). "*Kinetic study on the changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis induced by heat and high hydrostatic pressure pretreatment*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(18): 5621-5626.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., Highton, G. (2001). "*Industrial Microbiology: An Introduction*". Wiley-Blackwell.

7. ANEXO

7.1 Rectas de calibração

7.1.1 [Biomassa]

Tabela 30 – Resultados da concentração de biomassa e densidade óptica associados à primeira recta de calibração. Os valores sublinhados não foram usados para a obtenção da recta de calibração final, pois encontravam-se fora da gama de linearização.

Factor de diluição	[Biomassa] (g/L)	Densidade óptica final ($\lambda = 620 \text{ nm}$)
<u>1</u>	<u>0,9490</u>	<u>0,954</u>
<u>10</u>	<u>0,0949</u>	<u>0,623</u>
<u>15</u>	<u>0,0633</u>	<u>0,292</u>
<u>19</u>	<u>0,0499</u>	<u>0,151</u>
23	0,0413	0,127
<u>27</u>	<u>0,0351</u>	<u>0,104</u>
31	0,0306	0,089
<u>35</u>	<u>0,0271</u>	<u>0,074</u>
<u>39</u>	<u>0,0243</u>	<u>0,067</u>
43	0,0221	0,063
47	0,0202	0,059
51	0,0186	0,055
55	0,0173	0,050
59	0,0161	0,046
63	0,0151	0,047
67	0,0142	0,042
71	0,0134	0,040
75	0,0127	0,037
79	0,0120	0,034
83	0,0114	0,031
87	0,0109	0,028
<u>91</u>	<u>0,0104</u>	<u>0,022</u>

Tabela 31 – Resultados da concentração de biomassa e densidade óptica associados à segunda recta de calibração. Os valores sublinhados não foram usados para a obtenção da recta de calibração final, pois encontravam-se fora da gama de linearização.

Factor de diluição	[Biomassa] (g/L)	Densidade óptica final ($\lambda = 620 \text{ nm}$)
<u>1</u>	<u>3,4760</u>	<u>0,987</u>
<u>5</u>	<u>0,6952</u>	<u>0,933</u>
<u>10</u>	<u>0,3476</u>	<u>0,764</u>
<u>15</u>	<u>0,2317</u>	<u>0,603</u>
21	0,1655	0,527
24	0,1448	0,457
<u>31</u>	<u>0,1121</u>	<u>0,305</u>
41	0,0848	0,291
51	0,0682	0,241
61	0,0570	0,202
71	0,0490	0,161
81	0,0429	0,129
91	0,0382	0,124
101	0,0344	0,108
201	0,0173	0,039

7.2 Curvas de crescimento

Tabela 32 – Resultados ao longo do tempo associados à curva de crescimento

Tempo (h)	Densidade óptica final	Desvio padrão	[Biomassa] (g/L)	Nº microrganismos totais/ mL	CFU/mL	Desvio Padrão
0,0	0,155	0,013	0,0486	$4,8719 \times 10^7$	$9,9890 \times 10^5$	$3,326 \times 10^4$
2,0	0,179	0,034	0,0557	$7,7625 \times 10^7$	$1,2800 \times 10^6$	$3,946 \times 10^4$
3,0	0,199	0,004	0,0619	$1,0263 \times 10^8$		
4,0	0,267	0,042	0,0829	$1,8856 \times 10^8$	$2,1240 \times 10^6$	$8,060 \times 10^4$
6,0	0,805	0,041	0,2476	$8,6044 \times 10^8$	$3,9830 \times 10^6$	$2,901 \times 10^5$
7,5	1,483	0,081	0,4554	$1,7083 \times 10^9$	$1,2000 \times 10^7$	$3,416 \times 10^5$
9,0	1,851	0,029	0,5680	$2,1676 \times 10^9$	$1,8160 \times 10^7$	$4,650 \times 10^5$
10,0	1,947	0,036	0,5975	$2,2879 \times 10^9$	$2,7510 \times 10^7$	$8,566 \times 10^5$
14,0	3,125	0,186	0,9585	$3,7608 \times 10^9$	$4,0184 \times 10^7$	$1,579 \times 10^5$
16,5	3,491	0,024	1,0705	$4,2179 \times 10^9$	$5,8762 \times 10^7$	$1,249 \times 10^6$
20,0	5,149	0,254	1,5786	$6,2908 \times 10^9$	$8,5830 \times 10^7$	$3,609 \times 10^6$
26,5	7,536	0,837	2,3099	$9,2745 \times 10^9$	$1,2729 \times 10^8$	$2,748 \times 10^6$
31,0	9,552	0,898	2,9276	$1,1795 \times 10^{10}$	$1,7670 \times 10^8$	$2,279 \times 10^6$
43,0	13,557	0,293	4,1545	$1,6800 \times 10^{10}$	$3,0444 \times 10^8$	$1,115 \times 10^7$
53,0	15,049	0,242	4,6117	$1,8665 \times 10^{10}$	$3,2530 \times 10^8$	$1,155 \times 10^5$
63,0	15,951	0,021	4,8881	$1,9793 \times 10^{10}$	$2,6760 \times 10^8$	$5,747 \times 10^6$
70,0	14,376	0,113	4,4055	$1,7824 \times 10^{10}$	$3,4292 \times 10^8$	$1,459 \times 10^6$
79,0	15,534	0,314	4,7604	$1,9272 \times 10^{10}$	$2,7992 \times 10^8$	$3,020 \times 10^6$
172,0	14,714	0,740	4,5091	$1,8247 \times 10^{10}$	$2,8300 \times 10^8$	$5,760 \times 10^6$
222,5	13,950	0,020	4,2751	$1,7292 \times 10^{10}$	$2,9170 \times 10^8$	$1,528 \times 10^6$
238,5	14,135	0,039	4,3317	$1,7523 \times 10^{10}$	$3,1200 \times 10^8$	$3,650 \times 10^6$

Tabela 33 – Logaritmo natural dos parâmetros associados à curva de crescimento

Tempo (h)	ln (Densidade óptica final)	ln ([Biomassa]) (g/L)	ln (Nº microrganismos totais/mL)	ln (CFU/mL)
0,0	-1,862	-3,023	17,702	13,814
2,0	-1,723	-2,887	18,167	14,062
3,0	-1,617	-2,783	18,447	
4,0	-1,320	-2,490	19,055	14,569
6,0	-0,217	-1,396	20,573	15,198
7,5	0,394	-0,787	21,259	16,300
9,0	0,616	-0,566	21,497	16,715
10,0	0,666	-0,515	21,551	17,130
14,0	1,139	-0,042	22,048	17,509
16,5	1,250	0,068	22,163	17,889
20,0	1,639	0,457	22,562	18,268
26,5	2,020	0,837	22,951	18,662
31,0	2,257	1,074	23,191	18,990
43,0	2,607	1,424	23,545	19,534
53,0	2,711	1,529	23,650	19,600
63,0	2,770	1,587	23,709	19,405
70,0	2,666	1,483	23,604	19,653
79,0	2,743	1,560	23,682	19,450
172,0	2,689	1,506	23,627	19,461
222,5	2,636	1,453	23,574	19,491
238,5	2,649	1,466	23,587	19,559

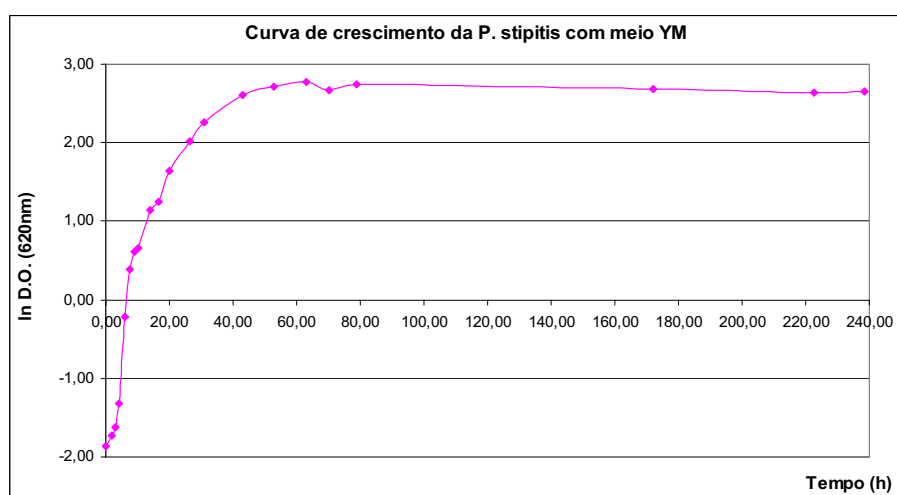


Figura 37 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural da densidade óptica

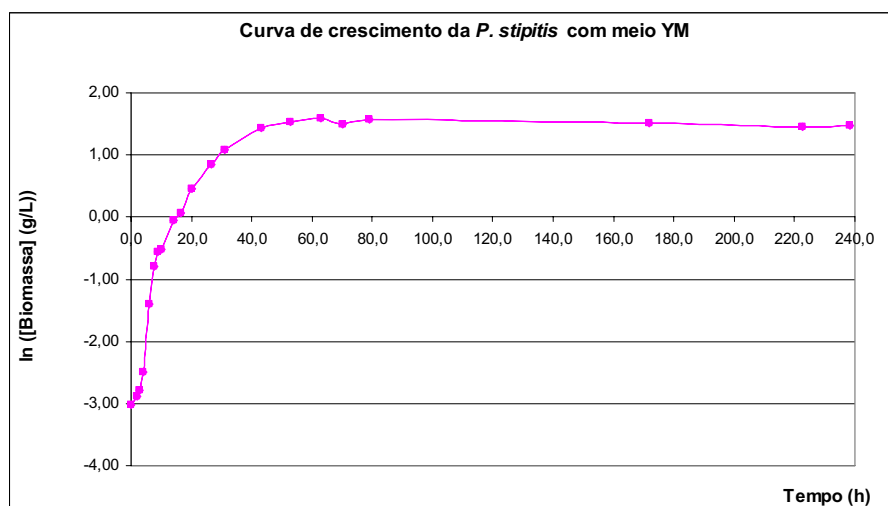


Figura 38 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural da concentração da biomassa

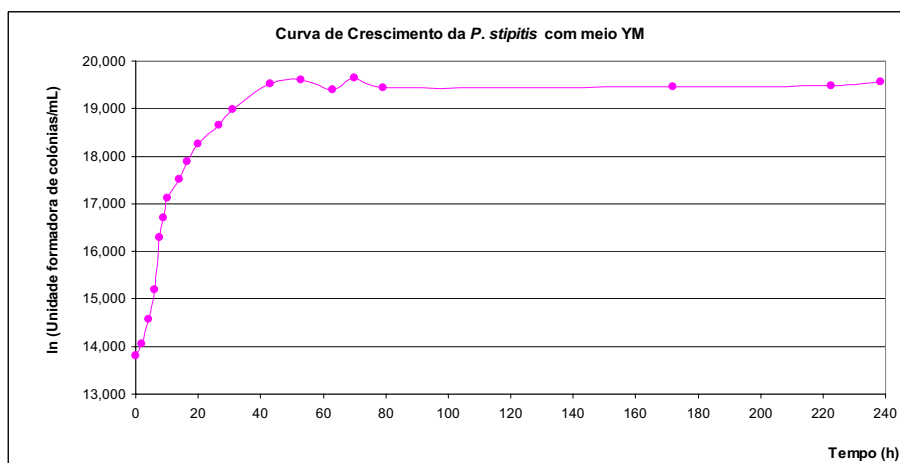


Figura 39 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural da unidade formadora de colônias

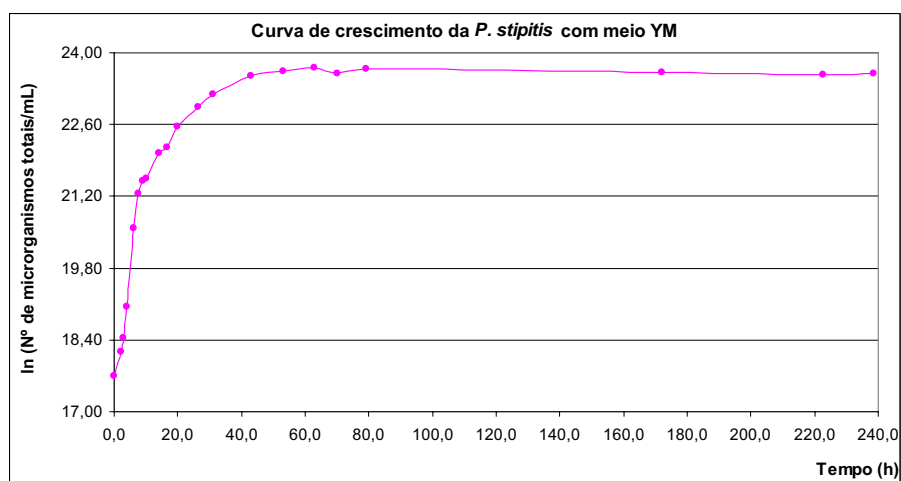


Figura 40 – Curva de crescimento expressa em logaritmo natural do número de microrganismos totais

7.3 Estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^0

Tabela 34 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 35,0 °C na diluição de 1×10^0

35,0 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/ N ₀	ln (N/ N ₀)
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,3600 \times 10^8$	$5,6569 \times 10^6$	$7,848 \times 10^{-1}$	-0,2424
7,5	$1,4200 \times 10^8$	$1,9779 \times 10^7$	$8,194 \times 10^{-1}$	-0,1992
15,0	$1,3400 \times 10^8$	$1,9806 \times 10^7$	$7,732 \times 10^{-1}$	-0,2572
20,0	$1,3100 \times 10^8$	$1,4142 \times 10^6$	$7,559 \times 10^{-1}$	-0,2798
30,0	$1,2733 \times 10^8$	$1,8856 \times 10^6$	$7,348 \times 10^{-1}$	-0,3082
55,0	$1,3167 \times 10^8$	$8,0139 \times 10^6$	$7,598 \times 10^{-1}$	-0,2748
85,0	$1,3000 \times 10^8$	$4,7140 \times 10^6$	$7,501 \times 10^{-1}$	-0,2875

Tabela 35 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 37,5 °C na diluição de 1×10^0

37,5 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/ N ₀	ln (N/ N ₀)
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$2,4300 \times 10^8$	$7,0711 \times 10^6$	$1,402 \times 10^0$	0,3380
7,5	$2,0900 \times 10^8$	$2,9698 \times 10^7$	$1,206 \times 10^0$	0,1873
15,0	$1,6767 \times 10^8$	$4,7140 \times 10^5$	$9,675 \times 10^{-1}$	-0,0330
20,0	$1,5600 \times 10^8$	$8,4853 \times 10^6$	$9,002 \times 10^{-1}$	-0,1052
32,0	$1,3278 \times 10^8$	$7,3853 \times 10^6$	$7,662 \times 10^{-1}$	-0,2663
55,0	$1,0867 \times 10^8$	$8,4853 \times 10^6$	$6,270 \times 10^{-1}$	-0,4667
85,0	$9,5333 \times 10^7$	$8,4859 \times 10^6$	$5,501 \times 10^{-1}$	-0,5976

Tabela 36 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^0

40,0 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/ N ₀	ln (N/ N ₀)
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,6000 \times 10^8$	$5,6569 \times 10^6$	$9,233 \times 10^{-1}$	-0,0799
7,5	$1,1000 \times 10^8$	$1,1314 \times 10^7$	$6,347 \times 10^{-1}$	-0,4545
15,0	$7,4000 \times 10^7$	$2,8284 \times 10^6$	$4,270 \times 10^{-1}$	-0,8510
30,0	$2,5000 \times 10^7$	$2,3570 \times 10^6$	$1,443 \times 10^{-1}$	-1,9361
55,0	$5,0222 \times 10^6$	$6,7387 \times 10^6$	$2,898 \times 10^{-2}$	-3,5412
85,0	$1,2833 \times 10^5$	$7,0711 \times 10^3$	$7,405 \times 10^{-4}$	-7,2081

Tabela 37 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^0

42,5 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,8267 \times 10^8$	$9,4281 \times 10^5$	$1,054 \times 10^0$	0,0526
7,5	$6,9333 \times 10^7$	$2,8284 \times 10^6$	$4,001 \times 10^{-1}$	-0,9161
10,0	$4,9067 \times 10^7$	$1,6028 \times 10^6$	$2,831 \times 10^{-1}$	-1,2618
15,0	$1,0711 \times 10^7$	$6,2225 \times 10^6$	$6,181 \times 10^{-2}$	-2,7837
32,0	$1,5800 \times 10^5$	$9,4281 \times 10^2$	$9,117 \times 10^{-4}$	-7,0002
55,0	$6,7333 \times 10^3$	$1,4142 \times 10^2$	$3,885 \times 10^{-5}$	-10,1557
85,0	$6,6667 \times 10^1$	$9,4281 \times 10^0$	$3,847 \times 10^{-7}$	-14,7708

Tabela 38 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^0

45,0 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$1,7330 \times 10^8$	$2,3544 \times 10^7$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$8,3667 \times 10^7$	$1,4142 \times 10^6$	$4,828 \times 10^{-1}$	-0,7282
5,0	$3,5333 \times 10^7$	$8,4853 \times 10^6$	$2,039 \times 10^{-1}$	-1,5902
7,5	$5,9333 \times 10^6$	$1,8856 \times 10^5$	$3,424 \times 10^{-2}$	-3,3744
15,0	$1,3900 \times 10^4$	$1,8903 \times 10^4$	$8,021 \times 10^{-5}$	-9,4309
32,0	$4,6667 \times 10^1$	$1,8876 \times 10^1$	$2,693 \times 10^{-7}$	-15,1275
41,0	$0,0000 \times 10^0$			

7.4 Estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

Tabela 39 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-2}

40,0 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$3,7333 \times 10^6$	$5,6569 \times 10^5$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$3,1467 \times 10^6$	$1,0920 \times 10^6$	$8,429 \times 10^{-1}$	-0,1710
7,5	$2,6489 \times 10^6$	$1,2845 \times 10^6$	$7,095 \times 10^{-1}$	-0,3432
15,0	$2,2133 \times 10^6$	$1,1314 \times 10^5$	$5,929 \times 10^{-1}$	-0,5228
30,0	$1,5933 \times 10^5$	$1,6028 \times 10^4$	$4,268 \times 10^{-2}$	-3,1541
55,0	$4,4533 \times 10^4$	$2,6399 \times 10^3$	$1,193 \times 10^{-2}$	-4,4288
85,0	$0,0000 \times 10^0$			

Tabela 40 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-2}

42,5 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$2,2300 \times 10^6$	$5,2326 \times 10^5$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,7233 \times 10^6$	$2,0270 \times 10^5$	$7,728 \times 10^{-1}$	-0,2577
5,0	$1,5700 \times 10^6$	$4,2426 \times 10^4$	$7,040 \times 10^{-1}$	-0,3509
7,5	$1,0633 \times 10^6$	$9,8995 \times 10^4$	$4,768 \times 10^{-1}$	-0,7406
15,0	$4,1667 \times 10^5$	$1,1785 \times 10^5$	$1,868 \times 10^{-1}$	-1,6775
30,0	$2,8333 \times 10^4$	$4,7140 \times 10^2$	$1,271 \times 10^{-2}$	-4,3657
55,0	$1,7667 \times 10^2$	$1,4142 \times 10^1$	$7,922 \times 10^{-5}$	-9,4432
85,0	$0,0000 \times 10^0$			

Tabela 41 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-2}

45,0 °C				
tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$2,2300 \times 10^6$	$5,2326 \times 10^5$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,2000 \times 10^6$	$1,8856 \times 10^5$	$5,381 \times 10^{-1}$	-0,6197
5,0	$2,2000 \times 10^5$	$3,7712 \times 10^4$	$9,865 \times 10^{-2}$	-2,3161
7,5	$1,9333 \times 10^4$	$9,4281 \times 10^2$	$8,670 \times 10^{-3}$	-4,7479
10,0	$4,4667 \times 10^3$	$2,8284 \times 10^2$	$2,003 \times 10^{-3}$	-6,2131
15,0	$2,8000 \times 10^2$	$2,8284 \times 10^1$	$1,256 \times 10^{-4}$	-8,9827
20,0	$5,3333 \times 10^1$	$1,8856 \times 10^1$	$2,392 \times 10^{-5}$	-10,6410
30,0	$0,0000 \times 10^0$			

7.5 Estabilidade térmica de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-4}

Tabela 42 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 40,0 °C na diluição de 1×10^{-4}

40,0 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0	$2,0367 \times 10^4$	$2,3099 \times 10^3$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,5567 \times 10^4$	$3,1584 \times 10^3$	$7,643 \times 10^{-1}$	-0,2688
7,5	$1,3267 \times 10^4$	$8,4853 \times 10^2$	$6,514 \times 10^{-1}$	-0,4286
15	$1,0800 \times 10^4$	$1,1314 \times 10^3$	$5,303 \times 10^{-1}$	-0,6344
30	$2,8000 \times 10^3$	$2,8284 \times 10^3$	$1,375 \times 10^{-1}$	-1,9843
55	$2,0333 \times 10^2$	$9,8995 \times 10^1$	$9,984 \times 10^{-3}$	-4,6068
85	$4,0000 \times 10^1$	$9,4281 \times 10^0$	$1,964 \times 10^{-3}$	-6,2328

Tabela 43 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 42,5 °C na diluição de 1×10^{-4}

42,5 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$2,0367 \times 10^4$	$2,3099 \times 10^3$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,5367 \times 10^4$	$9,8995 \times 10^2$	$7,545 \times 10^{-1}$	-0,2817
7,5	$7,3000 \times 10^3$	$9,8999 \times 10^2$	$3,584 \times 10^{-1}$	-1,0260
15,0	$2,8000 \times 10^3$	$1,8856 \times 10^2$	$1,375 \times 10^{-1}$	-1,9843
30,0	$1,2000 \times 10^2$	$1,1314 \times 10^2$	$5,892 \times 10^{-3}$	-5,1342
55,0	$0,0000 \times 10^0$			

Tabela 44 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 45,0 °C na diluição de 1×10^{-4}

45,0 °C				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$2,0367 \times 10^4$	$2,3099 \times 10^3$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$9,4000 \times 10^3$	$1,9799 \times 10^3$	$4,615 \times 10^{-1}$	-0,7732
5,0	$1,5289 \times 10^3$	$5,3422 \times 10^2$	$7,507 \times 10^{-2}$	-2,5894
7,5	$3,2000 \times 10^2$	$7,5425 \times 10^2$	$1,571 \times 10^{-2}$	-4,1533
10,0	$2,6667 \times 10^1$	$2,8284 \times 10^1$	$1,309 \times 10^{-3}$	-6,6382
15,0	$0,0000 \times 10^0$			

7.6 Efeito da pressão na inativação da levedura *P. stipitis*

Tabela 45 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^0

1×10^0				
Pressão (MPa)	CFU/mL	Desvio padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0	$4,1700 \times 10^8$	$6,6468 \times 10^7$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
50	$2,5400 \times 10^8$	$1,8856 \times 10^6$	$6,091 \times 10^{-1}$	-0,4958
100	$1,8267 \times 10^8$	$9,4281 \times 10^6$	$4,380 \times 10^{-1}$	-0,8254
150	$1,6467 \times 10^6$	$4,0541 \times 10^5$	$3,949 \times 10^{-3}$	-5,5343
200	$2,9333 \times 10^3$	$4,7140 \times 10^1$	$7,034 \times 10^{-6}$	-11,8647
250	$8,3333 \times 10^1$	$2,3570 \times 10^1$	$1,998 \times 10^{-7}$	-15,4257

Tabela 46 – Resultados das unidades formadoras de colónias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-2}

1×10^{-2}				
Pressão (MPa)	CFU/mL	Desvio padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0	$1,5033 \times 10^6$	$4,2426 \times 10^4$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
50	$2,0700 \times 10^6$	$1,9328 \times 10^5$	$1,377 \times 10^0$	0,3199
100	$2,7233 \times 10^6$	$2,9698 \times 10^5$	$1,812 \times 10^0$	0,5942
150	$4,5667 \times 10^4$	$8,0139 \times 10^3$	$3,038 \times 10^{-2}$	-3,4941
200	$6,6667 \times 10^1$	$1,8856 \times 10^1$	$4,435 \times 10^{-5}$	-10,0235
250	$0,0000 \times 10^0$			

Tabela 47 – Resultados das unidades formadoras de colônias em relação à pressão na diluição de 1×10^{-4}

1×10^{-4}				
Pressão (MPa)	CFU/mL	Desvio padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0	$2,5267 \times 10^4$	$7,6368 \times 10^3$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
50	$2,3500 \times 10^4$	$8,2496 \times 10^3$	$9,301 \times 10^{-1}$	-0,0725
100	$2,0967 \times 10^4$	$5,2326 \times 10^3$	$8,298 \times 10^{-1}$	-0,1866
150	$1,5000 \times 10^3$	$7,0711 \times 10^1$	$5,937 \times 10^{-2}$	-2,8240
200	$0,0000 \times 10^0$			
250	$0,0000 \times 10^0$			

7.7 Estabilidade bária de *P. stipitis* na diluição de 1×10^{-2}

Tabela 48 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 50MPa na diluição de 1×10^{-2}

50 Mpa				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$7,3667 \times 10^5$	$5,1854 \times 10^4$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$6,4667 \times 10^5$	$1,2257 \times 10^5$	$8,778 \times 10^{-1}$	-0,1303
5,5	$8,2667 \times 10^5$	$3,7712 \times 10^4$	$1,122 \times 10^0$	0,1153
10,0	$8,7333 \times 10^5$	$9,4281 \times 10^3$	$1,186 \times 10^0$	0,1702

Tabela 49 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 100MPa na diluição de 1×10^{-2}

100 Mpa				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$1,6033 \times 10^6$	$2,7813 \times 10^5$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$8,2667 \times 10^5$	$3,7712 \times 10^4$	$1,122 \times 10^0$	0,1153
5,0	$2,1500 \times 10^6$	$2,1213 \times 10^5$	$1,341 \times 10^0$	0,2934
10,0	$2,2867 \times 10^6$	$1,6028 \times 10^5$	$1,426 \times 10^0$	0,3550
15,0	$1,1167 \times 10^6$	$2,3570 \times 10^4$	$1,515 \times 10^0$	0,4160

Tabela 50 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 125MPa na diluição de 1×10^{-2}

125 Mpa				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$3,8667 \times 10^5$	$7,5425 \times 10^4$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$1,8333 \times 10^5$	$7,0711 \times 10^4$	$4,741 \times 10^{-1}$	-0,7463
5,0	$1,2000 \times 10^5$	$1,4142 \times 10^4$	$3,103 \times 10^{-1}$	-1,1701
10,0	$4,8000 \times 10^4$	$1,8856 \times 10^3$	$1,241 \times 10^{-1}$	-2,0864
15,0	$3,3333 \times 10^4$	$5,1854 \times 10^3$	$8,621 \times 10^{-2}$	-2,4510

Tabela 51 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 150MPa na diluição de 1×10^{-2}

150 Mpa				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$1,6033 \times 10^6$	$2,7813 \times 10^5$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
5,0	$3,0044 \times 10^5$	$9,3953 \times 10^4$	$1,874 \times 10^{-1}$	-1,6746
10,0	$3,9800 \times 10^4$	$4,0541 \times 10^3$	$2,482 \times 10^{-2}$	-3,6960
16,0	$1,7267 \times 10^4$	$1,0371 \times 10^3$	$2,344 \times 10^{-2}$	-3,7534
22,0	$2,3100 \times 10^3$	$1,5415 \times 10^3$	$3,136 \times 10^{-3}$	-5,7649

Tabela 52 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 175MPa na diluição de 1×10^{-2}

175 Mpa				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$3,8667 \times 10^5$	$7,5425 \times 10^4$	$1,0000 \times 10^0$	0,0000
2,5	$3,1000 \times 10^4$	$3,2998 \times 10^3$	$8,0172 \times 10^{-2}$	-2,5236
5,0	$2,5500 \times 10^3$	$1,7206 \times 10^3$	$6,5948 \times 10^{-3}$	-5,0215
10,0	$1,0333 \times 10^2$	$5,1854 \times 10^1$	$2,6724 \times 10^{-4}$	-8,2274
15,0	$1,2530 \times 10^1$	$7,1924 \times 10^0$	$3,2405 \times 10^{-5}$	-10,3372

Tabela 53 – Resultados das unidades formadoras de coloniais a 200MPa na diluição de 1×10^{-2}

200 Mpa				
Tempo (min)	CFU/mL	Desvio Padrão	N/N ₀	ln (N/N ₀)
0,0	$1,6033 \times 10^6$	$2,7813 \times 10^5$	$1,000 \times 10^0$	0,0000
1,5	$5,8133 \times 10^4$	$3,3941 \times 10^3$	$7,891 \times 10^{-2}$	-2,5394
3,0	$1,4000 \times 10^2$	$1,7913 \times 10^2$	$1,900 \times 10^{-4}$	-8,5683
5,0	$5,3333 \times 10^1$	$2,8284 \times 10^0$	$3,326 \times 10^{-5}$	-10,3110
10,0	$2,0000 \times 10^1$	$9,4281 \times 10^0$	$1,247 \times 10^{-5}$	-11,2919